



Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

**Mecanismo molecular implicado en la
configuración del peptidoma de HLA-B*27 por
variantes naturales de ERAP1 asociadas a la
espondilitis anquilosante**

Alejandro Sanz Bravo

Marzo, 2015

Memoria para optar al grado de Doctor en Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid.

Presentada por: Alejandro Sanz Bravo.

***Director: José Antonio López de Castro Álvarez, Profesor de Investigación del C.S.I.C.
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.***

Tutor: Manuel Soto Álvarez, Profesor Titular de la Universidad Autónoma de Madrid.

A mi Padre, por su ejemplo de humildad y superación en la vida.

Summary

HLA-B*27 is the main genetic risk factor for ankylosing spondylitis (AS), but its pathogenetic role remains unknown. As for any other MHC-I molecule, the canonic function of HLA-B*27 is to present peptides from viruses and other intracellular parasites for recognition by cytolytic T-lymphocytes. Genetic analyses have determined that ERAP1, a resident aminopeptidase of the endoplasmic reticulum whose function is to trim peptides to their optimal length for binding to MHC-I molecules, is associated with AS only among HLA-B*27⁺ individuals. Thus ERAP1 polymorphism may affect AS pathogenesis by altering peptide-dependent features of the HLA-B*27 molecule.

The aim of this thesis was to characterize the nature and extent of the alterations induced by disease-associated ERAP1 polymorphism on the HLA-B*27 peptidome in live cells and to define the molecular basis for these effects. This was carried out by means of comparative analyses of the HLAB*27:04 and HLA-B*27:05 peptidomes from cell lines expressing distinct ERAP1 variants carrying disease-associated polymorphisms. The results indicated that ERAP1 polymorphism induced substantial alterations on the expression levels, molecular mass, length, sequence and affinity of many peptides. Polymorphisms associated with increased risk of disease, in particular K528, induced an optimization of the global affinity of the HLA-B*27:05 peptidome by influencing the sequence of the peptides. A combination of protective polymorphisms resulted in the generation of a suboptimal HLA-B*27:04 peptidome, in terms of length and affinity, that reduced the global stability of the molecule. The mechanism by which ERAP1 variants affected the HLA-B*27 peptidome was by altering the balance between epitope generation and destruction as a function of the susceptibility of the N-terminal flanking sequences and the P1 residues to trimming. These alterations were both variant and peptide-dependent.

The magnitude and complexity of the effects of ERAP1 polymorphism on the nature and affinity of the peptidome was such that it could affect not only specific antigen presentation, but also other peptide-dependent features of HLA-B*27 potentially able to alter its pro-inflammatory and autoimmune potential.

The susceptibility to ERAP1 trimming of the P1 residues in the peptidomes of HLA-B*27 subtypes differentially associated with AS was also examined. This analysis revealed that the relative frequency of P1 residues resistant and highly susceptible to this enzyme in AS-associated and non-AS-associated subtypes paralleled the pattern observed in the HLA-B*27:05 peptidome in the context of ERAP1 variants with high and low activity, respectively. This suggests that non-AS-associated HLA-B*27 subtypes are less influenced by ERAP1 polymorphism than AS-associated ones.

Abreviaturas

aa: aminoácidos.

β2m: β2-microglobulina.

CTL: *Cytotoxic T Lymphocyte.*

DMP: *Deviation from Mean in the Proteome.*

DRiP: *Defective Ribosomal Products.*

DUBs: *De-Ubiquitilation enzymes.*

EA: Espondilitis Anquilosante.

EBV: *Epstein barr-virus.*

ERAP: *Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase.*

HC: *Heavy Chain.*

HLA: *Human Leucocyte Antigen.*

HPLC: *High Perfomance Liquid Chromatogrphy.*

IDE: *Insulin Degrading Enzyme.*

Ig: Inmunoglobulina.

IL: interleucina.

LCL: *Lymphoblastoid Cell Line.*

mab: *Monoclonal antibody.*

MALDI-TOF: *Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time Of Flight.*

MHC: *Mayor Histocompatibility Complex.*

MS: *Mass Spectrometry.*

m/z: Relación masa/ carga.

MW: *Molecular Weight.*

NMD: *Nonsense-Mediated Decay.*

pMHC: *peptide-Mayor Histocompatibility Complex.*

PSA: *Puromycin-Sensitive Aminopeptidase.*

qRT-PCR *Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* .

RI: Relación de intensidades.

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*.

TCR: *T Cell Receptor*.

TFA: Ácido trifluoroacético.

TPP II: *Tripeptidyl Peptidase II*.

INTRODUCCIÓN.....	(p. 5).
I.1. El Sistema principal de histocompatibilidad de clase I (MHC-I).....	(p. 8).
I.2. El MHC-I y su relación con enfermedades autoinmunes o autoinflamatorias.....	(p. 9).
I.3. HLA-B*27 y enfermedad.....	(p. 9).
I.3.1. Características estructurales y especificidad de unión de péptidos.....	(p. 11).
I.4. Vía de presentación antigénica por moléculas del MHC-I.....	(p. 12).
I.4.1. Procesamiento proteasómico.....	(p. 12).
I.4.2. Procesamiento no proteasómico.....	(p. 13).
I.4.3. Procesamiento postproteasómico en el citosol.....	(p. 14).
I.4.4. Transporte y procesamiento final de los antígenos del MHC-I en el retículo endoplásmico.....	(p. 14).
I.4.5. Ensamblaje y expresión en la membrana plasmática del complejo péptido-MHC-I.....	(p. 15).
I.5. Características generales y mecanismo de acción de ERAP1.....	(p. 17).
I.5.1. ERAP1 y su asociación con autoinmunidad.....	(p. 19).
I.5.2. Polimorfismos de ERAP1 asociados a espondilitis anquilosante.....	(p. 19).
I.5.3. Efecto de los polimorfismos de ERAP1 sobre su actividad enzimática.....	(p. 20).
OBJETIVOS.....	(p. 23).
MATERIALES Y MÉTODOS.....	(p. 27).
M.1. Líneas celulares y anticuerpos monoclonales.....	(p. 29).
M.2. Aislamiento y purificación de péptidos unidos a HLA-B*27.....	(p. 30).
M.3. Espectrometría de Masas (MS).....	(p. 31).
M.3.1. Fragmentación por MS/MS MALDI-TOF/TOF.....	(p. 31).
M.4. Caracterización de variantes naturales del gen de ERAP1 y ERAP2 en líneas celulares.....	(p. 31).
M.4.1. Tipaje de SNP no sinónimos.....	(p. 31).
M.4.2. Secuenciación genómica.....	(p. 32).
M.4.3. Análisis de la expresión de proteína por Western blot.....	(p. 32).
M.5. Análisis comparativo de los niveles de expresión de ligandos de HLA-B*27.....	(p. 32).
M.6. Susceptibilidad diferencial de los residuos N-terminales a la hidrólisis por ERAP1.....	(p. 33).
M.7. Contribución de la secuencia del ligando a la hidrólisis de los residuos por ERAP1.....	(p. 33).
M.8. Ensayos de termoestabilidad.....	(p. 34).
M.9. Cálculo de las afinidades de los péptidos por el MHC-I y de sus diferencias estadísticas.....	(p. 34).

RESULTADOS.....	(p. 37).
EFFECTO DEL POLIMORFISMO DE ERAP1 SOBRE EL PEPTIDOMA DE HLA-B*27.....	(p. 39).
<u>R.1. Efecto del polimorfismo de ERAP1 sobre el peptidoma de HLA-B*27:04.....</u>	<u>(p. 39).</u>
R.1.1. Caracterización de ERAP1 y ERAP2 en líneas celulares HLA-B*27:04 ⁺	(p. 39).
R.1.2. Análisis comparativo de la expresión de ligandos de HLA-B*27:04.....	(p. 40).
R.1.2.1. Comparación de los peptidomas de HLA-B*27:04 expresados en contextos de ERAP1 disparos.....	(p. 42).
R.1.2.2. Comparación de los peptidomas de HLA-B*27:04 expresados en contextos de ERAP1 similares.....	(p. 42).
R.1.2.3. Efecto del polimorfismo de ERAP1 sobre la longitud de los ligandos de HLA- B*27:04.....	(p. 45).
R.1.2.4. Efecto del polimorfismo de ERAP1 independiente de la longitud sobre los ligandos de HLA-B*27:04.....	(p. 47).
R.1.3. Mecanismo molecular de la expresión diferencial de ligandos de HLA-B*27:04 asociada al polimorfismo de ERAP1.....	(p. 49).
R.1.3.1. Efecto de la susceptibilidad de los residuos flanqueantes y de P1 a la hidrólisis por ERAP1 sobre el peptidoma de HLA-B*27:04.....	(p. 49).
R.1.3.2. Efecto de la secuencia interna del ligando sobre la hidrólisis por ERAP1.....	(p. 50).
R.1.4. Efecto del polimorfismo de ERAP1 sobre la termoestabilidad de HLA-B*27:04.....	(p. 51).
R.1.5. Resumen.....	(p. 51).
<u>R.2. Efecto del polimorfismo de ERAP1 sobre el peptidoma de HLA-B*27:05.....</u>	<u>(p. 53).</u>
R.2.1. Caracterización de ERAP1 y ERAP2 en líneas celulares HLA-B*27:05 ⁺	(p. 53).
R.2.2. Análisis comparativo de la expresión de ligandos de HLA-B*27:05 en diferentes contextos de ERAP1.....	(p. 55).
R.2.2.1. Efecto dominante del polimorfismo K528R sobre el peptidoma de HLA-B*27:05.....	(p. 55).
R.2.2.2. El efecto del polimorfismo de ERAP1 sobre el peso molecular implica diferencias en la secuencia pero no en la longitud de los ligandos de HLA-B*27:05.....	(p. 57).
R.2.3. Mecanismo molecular de la expresión diferencial de ligandos asociada al polimorfismo de ERAP1.....	(p. 58).
R.2.3.1. El polimorfismo de ERAP1 configura el peptidoma de HLA-B*27:05 en base a la susceptibilidad del residuo P1.....	(p. 58).
R.2.3.2. El polimorfismo K528R en ERAP1 configura el peptidoma de HLA-B*27:05 mediante un uso diferencial de residuos en múltiples posiciones de los ligandos.....	(p. 61).
R.2.4. Resumen.....	(p. 62).

R.3. Influencia diferencial de ERAP1 sobre el peptidoma de subtipos de HLA-B*27 con distinta termoestabilidad y asociación a espondilitis anquilosante..... (p. 63).

R.4. Influencia del polimorfismo de ERAP1 en la afinidad de los ligandos de HLA-B*27:04 y 05..... (p. 66).

DISCUSIÓN..... (p. 69).

D.1. Consideraciones metodológicas..... (p. 71).

D.1.1. Estimación de cambios globales en el peptidoma de HLA-B*27..... (p. 71).

D.1.2. Clasificación del peptidoma en base a la abundancia relativa de los ligandos en distintas líneas celulares..... (p. 72).

D.2. Mecanismo de interacción funcional entre ERAP1 y HLA-B*27..... (p. 73).

D.3. El papel del polimorfismo de ERAP1 en la configuración de los peptidomas de HLA-B*27:04 y 05... (p. 75).

D.4. Polimorfismo de ERAP1 y afinidad del peptidoma..... (p. 77).

D.5. Interacción diferencial entre ERAP1 y subtipos de HLA-B*27 asociados diferencialmente a espondilitis anquilosante..... (p. 78).

D.6. Convergencia funcional entre la asociación diferencial de variantes de ERAP1 y subtipos de HLA-B*27 a espondilitis anquilosante..... (p. 79).

D.7. Modulación del potencial patogénico de HLA-B*27 por ERAP1..... (p. 79).

D.8. ERAP1 y la patogenia de enfermedades asociadas a MHC-I..... (p. 80).

CONCLUSIONES..... (p. 83).

REFERENCIAS..... (p. 87).

Apéndice I: García-Medel, N¹, Sanz-Bravo, A¹, Van Nguyen, D., Galocha, B., Gómez-Molina, P., Martín-Esteban, A., Alvarez-Navarro, C., López de Castro, J.A., (2012). *Functional Interaction of the Ankylosing Spondylitis-associated Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 Polymorphism and HLA-B27 in Vivo*. Mol. Cell. Proteomics. 11, 1416–1429. ¹**Ambos autores han contribuido por igual a este trabajo.**

Apéndice II: **Alejandro Sanz-Bravo**, José Campos, Marina S. Mazariegos, and José A. López de Castro, (2015). *Dominant role of the ERAP1 polymorphism R528K in shaping the HLA-B27 peptidome through differential processing determined by multiple peptide residues*. Arthr. & Rheum. 67, 692-701.

Apéndice III: García-Medel, N., **Sanz-Bravo, A.**, Alvarez-Navarro, C., Gómez-Molina, P., Barnea, E., Marcilla, M., Admon, A., López de Castro, J.A., (2014). *Peptide Handling by HLA-B27 Subtypes Influences Their Biological Behavior, Association with Ankylosing Spondylitis and Susceptibility to Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 (ERAP1)*. Mol. Cell. Proteomics. 13, 3367–80. *El material suplementario de este artículo está incluido en la versión digital de esta Tesis.

Otras publicaciones realizadas durante el desarrollo de esta Tesis:

- Noel García-Medel, **Alejandro Sanz-Bravo**, Eilon Barnea, Arie Admon, and José A. López de Castro (2011). *The Origin of Proteasome-inhibitor Resistant HLA Class I Peptidomes: a Study With HLA-A*68:01*. Mol. Cell. Proteomics. 11, 1- 15.
- Martín-Esteban A., Gómez-Molina P. **Alejandro Sanz-Bravo**, and López de Castro JA (2014). *Combined effects of Ankylosing Spondylitis- associated ERAP1 polymorphisms outside the catalytic and peptide-binding sites on the processing of natural HLA-B27 ligands*. J. Biol. Chem. 289, 3978-3990.

Introducción

INTRODUCCIÓN

El sistema inmune está constituido por un conjunto de moléculas, células y órganos encargados de proteger el organismo frente a patógenos, toxinas o procesos endógenos aberrantes como el cáncer. Los elementos de defensa pueden ser innatos o adaptativos, siendo los innatos la primera barrera contra los patógenos. Para efectuar estas tareas el primer requisito esencial es diferenciar aquellos elementos propios del organismo de los ajenos. En el ser humano existe un conjunto de antígenos leucocitarios (HLA) que se encargan de mostrar en la superficie celular un amplio espectro de fragmentos peptídicos propios a las células del sistema inmune, para vigilar el correcto funcionamiento celular.

El sistema inmune adaptativo está representado básicamente por dos tipos celulares: los linfocitos T que maduran en el timo y los linfocitos B que maduran en la médula ósea. Los linfocitos T se clasifican de forma general en dos poblaciones en función de la molécula presentadora de antígeno por la que están restringidos: por un lado, los linfocitos TCD8^+ o citotóxicos (CTL) están restringidos por el sistema principal de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) y se encargan de la eliminación de reservorios víricos en el interior celular así como de la detección y muerte de células en procesos de transformación; por otro lado, los linfocitos TCD4^+ o colaboradores están restringidos por el MHC-II y se encargan de la detección de antígenos procedentes de patógenos extracelulares para la señalización de una respuesta humoral o celular contra dichos patógenos. Finalmente los linfocitos B se encargan de la generación de una respuesta muy específica contra dichos elementos por medio de anticuerpos.

La regulación de todos los elementos de reconocimiento de lo propio y ajeno es un proceso crítico para evitar reacciones que dañen o ataquen directamente al organismo. Este fenómeno se conoce como tolerancia y cuando falla se puede desencadenar una patología autoinmune que ocasiona un daño agudo y/o crónico. La tolerancia se establece en dos pasos; en el primero, que también se conoce como tolerancia central, los precursores linfocitarios T y B se enfrentan al reconocimiento de los antígenos propios en los órganos linfoides primarios del timo y médula ósea, respectivamente. Aquellos linfocitos T cuyo receptor (TCR) reconozca con elevada afinidad a los antígenos propios morirán por apoptosis. Este mismo proceso se aplica a los linfocitos B y su reconocimiento antigénico mediante el BCR. En segundo lugar, dado que la expresión de todas las proteínas de un organismo no es ubicua, deben establecerse mecanismos que vuelvan tolerogénicos a aquellos linfocitos que puedan reconocer antígenos propios cuya expresión sea específica de un tejido, este proceso se conoce como tolerancia periférica y es mediado fundamentalmente por linfocitos T reguladores.

La regulación de la tolerancia no es un proceso perfecto, lo cual implica la circulación de linfocitos autorreactivos por el organismo; para evitar un posible daño, el sistema inmune induce a este conjunto de células a un estado inoperativo o de anergia. Los mecanismos que establecen la tolerancia para los linfocitos T están más regulados que para los linfocitos B, por lo que son más comunes las enfermedades autoinmunes asociadas al MHC-II mediada por autoanticuerpos.

I.1. El Sistema principal de histocompatibilidad de clase I (MHC-I)

La molécula de MHC-I está formada por una cadena pesada (HC) polimórfica de 44 KDa y una cadena ligera o β -2-microglobulina (β 2m) de 12 KDa. La HC consta de una región extracelular de 274 aminoácidos (aa), una región transmembrana de unos 30 aa y una porción intracitoplásmica de unos 25 aa. La porción extracelular se subdivide en tres dominios de 90-91 residuos denominados α 1 y α 2 y α 3 (Orr et al., 1979). Los dos primeros dominios forman el sitio de unión de péptido, constituido por una lámina β de 8 bandas antiparalelas y delimitado lateralmente por dos hélices α . Su tamaño es de unos 25 x 12 Å (Bjorkman et al., 1987; Saper et al., 1991; Guo et al., 1992; Madden et al., 1993; Madden, 1995). El dominio α 3 y la β 2m, que interacciona con los tres dominios de la HC, adoptan un plegamiento homólogo a las regiones constantes de las inmunoglobulinas. La estabilización de la molécula requiere de la unión constitutiva de péptidos. Estos se unen mediante interacciones no covalentes que implican el esqueleto peptídico y las cadenas laterales de varios residuos denominados de anclaje. Éstos interaccionan en un conjunto de subcavidades del sitio de unión de péptido (designadas de la A a la F), cuyo tamaño y polaridad están determinados por el polimorfismo del MHC (Garrett et al., 1989; Saper et al., 1991; Bouvier and Wiley, 1994). Esta variabilidad impone restricciones estructurales distintas a los ligandos de las diferentes moléculas del MHC-I, dando lugar a motivos estructurales característicos de alotipo (Falk et al., 1991).

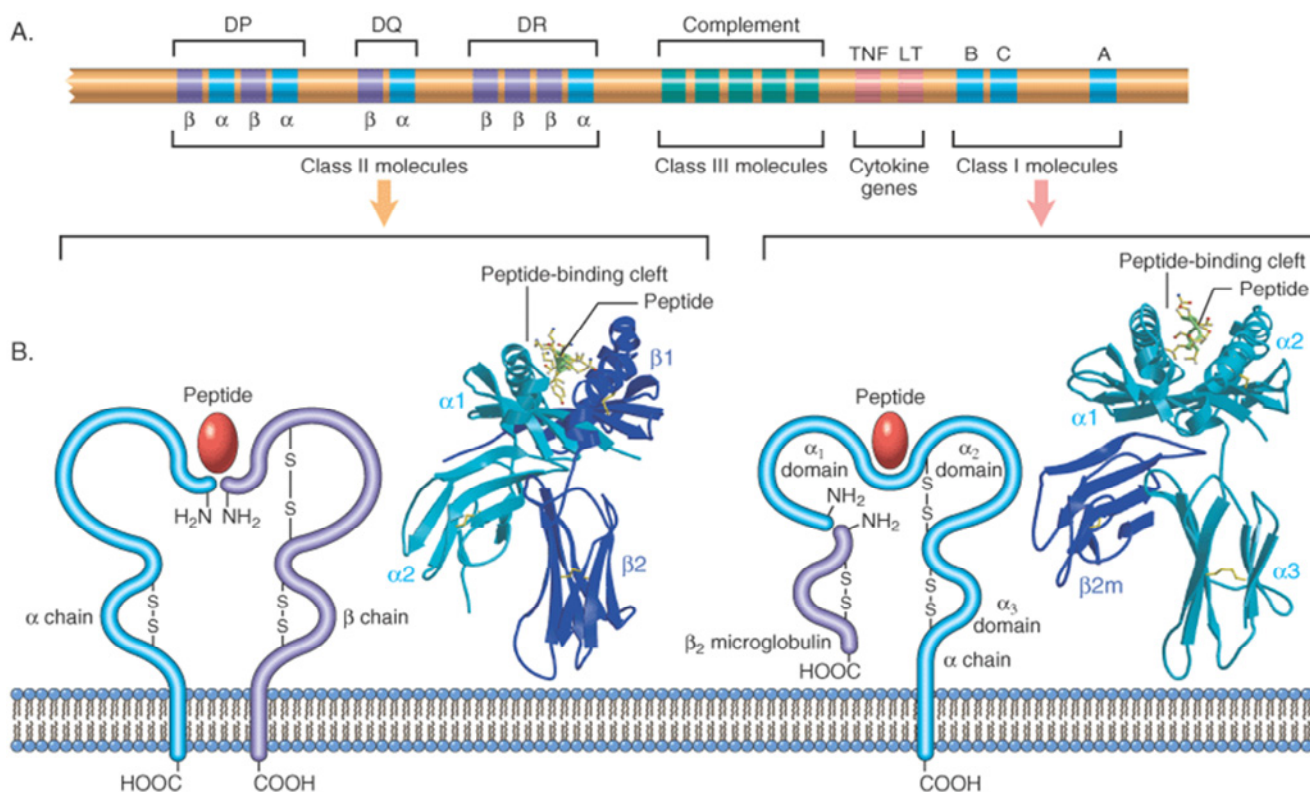


Figura 1. Esquema de la región génica del MHC y de las moléculas del MHC-I y MHC-II. A) Esquema representativo de los genes del MHC-II, proteínas del complemento, citocinas y el MHC-I. B) Representación de una molécula del MHC-II (izquierda) y de una molécula del MHC-I (derecha) en la membrana plasmática. <http://medicinembbs.blogspot.com.es/2011/03/process-of-immunity-images.html>

La zona central del péptido está generalmente expuesta al reconocimiento por el TCR. Las subcavidades A y F unen los residuos N- y C-terminal respectivamente. La subcavidad B une el residuo en posición 2, que es frecuentemente un residuo de anclaje principal (Saper *et al.*, 1991; Bouvier *et al.*, 1994).

El mecanismo de activación de los CTL está restringido tanto por el alotipo del MHC-I como por el péptido presentado, por lo que el reconocimiento entre el complejo TCR-péptido-MHC-I es clave tanto en la selección del repertorio de linfocitos T en el timo como en la estimulación de la respuesta inmune. Para la activación de un linfocito T restringido por el MHC-I es necesario el correceptor CD8 que reconoce el dominio $\alpha 3$ de la HC (Littman, 1989).

I.2. El MHC-I y su relación con enfermedades autoinmunes o inflamatorias

La región del MHC es la que presenta la mayor asociación con enfermedades autoinmunes o inflamatorias (Price *et al.*, 1999). Gracias a los avances tecnológicos en genética molecular así como en el conocimiento de la estructura de las moléculas del MHC-I, se pudieron precisar los polimorfismos asociados a estas enfermedades. Generalmente estas patologías son poligénicas por lo que la probabilidad de desarrollarlas se ve incrementada en pacientes con antecedentes familiares. De los alelos del MHC-I, HLA-B*27 es uno en los que más se ha profundizado en relación a las patologías con las que se asocia, genéricamente denominadas espondiloartropatías, como son: espondilitis anquilosante, EA, (Brewerton *et al.*, 1973b), artritis reactiva (Brewerton *et al.*, 1973a) y uveítis anterior aguda, entre otras. Otros alelos del locus B, también se asocian con enfermedades inflamatorias así, HLA-B*51 se asocia con la enfermedad de Behçet, HLA-Cw*0602 es el principal factor de riesgo para la psoriasis y HLA-A*29 lo es para la coriorretinopatía en perdigonada y constituye la asociación más fuerte entre un gen del MHC-I y una enfermedad. Algunos de los alelos asociados a enfermedad son en realidad particularmente beneficiosos en el control de infecciones. Por ejemplo, para el caso de HLA-B*27 se ha descrito una mayor capacidad de control sobre el VIH (O'Brien *et al.*, 2001; Kiepiela *et al.*, 2004) y otras infecciones víricas.

I.3. HLA-B*27 y enfermedad

Esta molécula ha sido ampliamente estudiada por su asociación con las espondiloartropatías, las cuales son un conjunto de enfermedades inflamatorias sistémicas crónicas, de etiología desconocida y que afectan primariamente al esqueleto axial y las entesis y cuyo prototipo es la EA. HLA-B*27 presenta una frecuencia variable dentro de la población, siendo del 4 al 8% en los caucásicos. Si bien cerca del 90% de los enfermos con EA son HLA-B*27⁺ solo desarrollan la enfermedad entre el 1-2% de los individuos portadores de este alelo. Hay descritos numerosos subtipos de HLA-B*27, pero algunos de ellos debido a su frecuencia y prevalencia en los pacientes han sido los más estudiados. Entre dichos subtipos distinguimos los asociados a EA (HLA-B*27:02, 04, 05 y 07) y los no asociados (HLA-B*27:06 y 09). El subtipo ancestral y más frecuente en población caucasoide es

HLA-B*27:05. Actualmente se investigan tres hipótesis (**Figura 2**) que podrían explicar el potencial patogénico de esta molécula en las espondiloartropatías:

1) **Hipótesis del péptido artrítico:** se basa en la posibilidad de que HLA-B*27 pueda presentar un péptido heterólogo que tenga mimetismo con un antígeno propio. La respuesta inmune contra el antígeno exógeno provocaría la pérdida de la tolerancia al péptido propio desencadenando una reacción autoinmune. Esta hipótesis fue formulada en los años 90 por Benjamin y Parham (Benjamin and Parham, 1990; Benjamin et al., 1991).

2) **Hipótesis del mal plegamiento de la cadena pesada:** basada en la acumulación de HC en el retículo endoplásmico (RE) debido a la tendencia de HLA-B*27 a plegarse mal. Esto generaría una respuesta de estrés que activaría la producción de citocinas proinflamatorias y otras implicadas en la remodelación ósea (Mear et al., 1999; Colbert, 2000a; Colbert, 2000b; DeLay et al., 2009).

3) **Inmunomodulación mediada por homodímeros de HC:** se basa en trabajos en los que se ha descrito que HLA-B*27 puede disociarse de la β_2m en la superficie celular y formar homodímeros de HC que son reconocidos por receptores leucocitarios como KIR3DL2 (Kollnberger et al., 2004; Chan et al., 2005; Kollnberger et al., 2007; Bowness et al., 2011a; Payeli et al., 2012; Wong-Baeza et al., 2013). Este reconocimiento provocaría la producción de IL17 por células Th17 portadoras de dicho receptor.

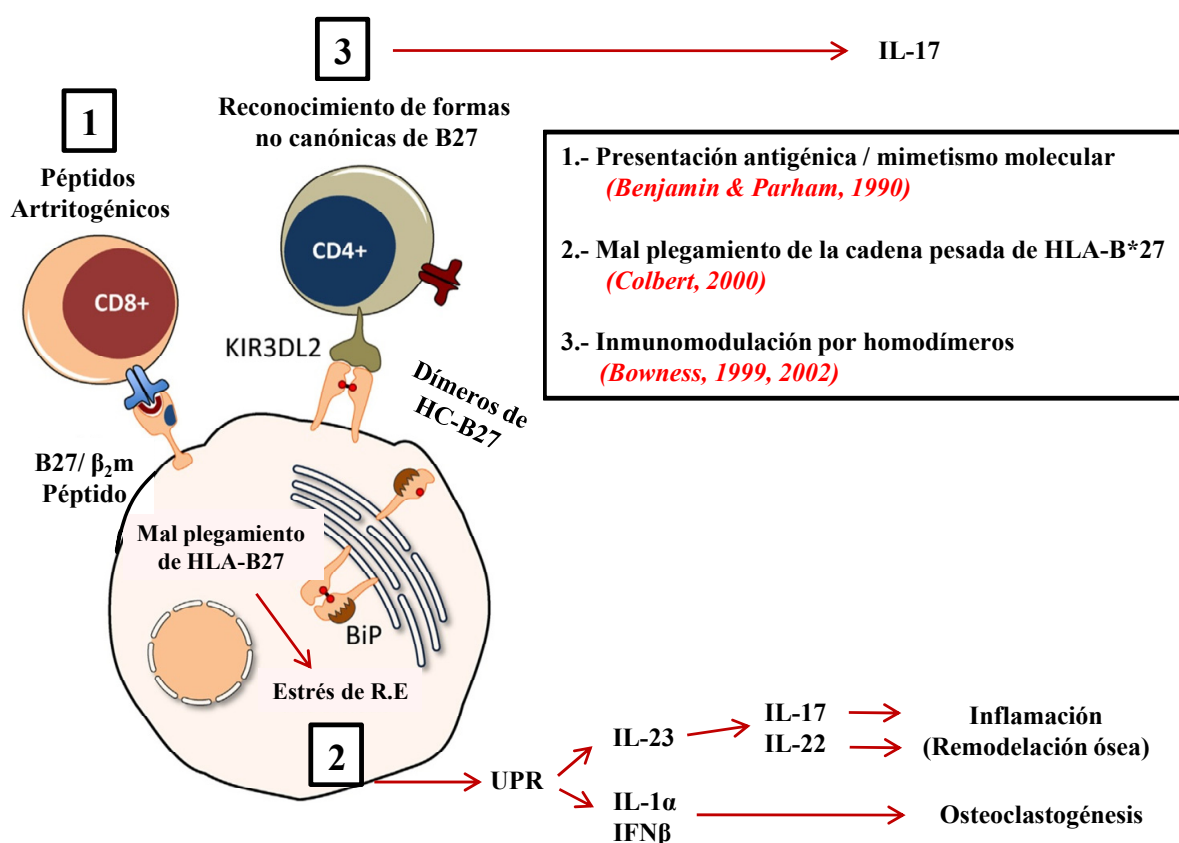


Figura 2. Resumen esquemático de las tres hipótesis más importantes acerca de la capacidad patogénica de HLA-B*27 en relación a la espondilitis anquilosante. 1.- Hipótesis del péptido artrítico. 2.- Hipótesis del mal plegamiento de la cadena pesada. 3.- Inmunomodulación mediada por homodímeros de HC. Modificado de (Colbert et al., 2014).

I.3.1. Características estructurales y especificidad de unión de péptidos

La característica que engloba a la especificidad peptídica de todos los subtipos de HLA-B*27 es la fuerte restricción por Arg en posición 2 (**Figura 3**) (Jardetzky et al., 1991; Madden et al., 1992; Lopez de Castro *et al.*, 2004), aunque se han identificado algunos péptidos con Gln en esta posición (Alvarez et al., 2001a; Ben Dror et al., 2010; Infantes et al., 2013).

Todos los subtipos que se mencionan en esta Tesis (HLA-B*27:02, 04, 05, 06, 07 y 09), presentan la misma estructura en las subcavidades A y B pero difieren en al menos un residuo en la subcavidad F, implicada en la unión del residuo C-terminal del ligando (**Tabla I**). Los residuos C-terminales más abundantes en los ligandos de todos los subtipos son Phe y Leu. La característica distintiva principal en la subcavidad F es la presencia o no de Asp116. Los subtipos con Asp116 (HLA-B*27:02, 04, y 05) unen péptidos con residuos C-terminales generalmente más masivos y con mayor permisividad química. Los subtipos que carecen del Asp116 (HLA-B*27:06, 07 y 09) unen mayoritariamente residuos apolares y de menor tamaño (Garcia-Medel *et al.*, 2014). Además de las posiciones principales de anclaje, podemos definir otras posiciones de anclaje secundarias como P1 y P3. En P1 predominan Ala, Gly, Ser, Lys y Arg para todos los subtipos. En P3 el predominio general es de residuos alifáticos o aromáticos, aunque HLA-B*27:04 y 06 presentan una permisividad adicional por residuos básicos.

La naturaleza del residuo 116 se correlaciona asimismo con dos subconjuntos de subtipos; los de alta termoestabilidad y plegamiento lento (HLA-B*27:02, 04 y 05) y los de baja termoestabilidad y plegamiento rápido (HLA-B*27:06, 07 y 09) (Galocha and López de Castro, 2010). Parece, por tanto, que este residuo es una característica estructural crítica que determina la especificidad peptídica, plegamiento y estabilidad molecular de HLA-B*27 (**Tabla I**), al menos entre los subtipos idénticos en las subcavidades A y B (Garcia-Medel *et al.*, 2014).

Subtipo (EA/ No EA)	Residuo posición 116	Plegamiento	Termoestabilidad	Residuos peptídicos C-terminales	
B*27:02	Asp	Lento	Alta	No polar, Tyr	Grande
B*27:04	Asp	Lento	Alta	No polar, Tyr	Grande
B*27:05	Asp	Lento	Alta	No polar, Tyr, Básico	Grande
B*27:06	Tyr	Rápido	Baja	No polar	Pequeño
B*27:07	Tyr	Rápido	Baja	No polar	Pequeño
B*27:09	Tyr	Rápido	Baja	No polar	Pequeño

Tabla I. Características más destacables de los subtipos asociados y no asociados a EA relacionadas con el polimorfismo en la posición 116: plegamiento, termoestabilidad y tipo de residuos peptídicos C-terminales. Los subtipos asociados o no con EA se representan en rojo y verde, respectivamente.

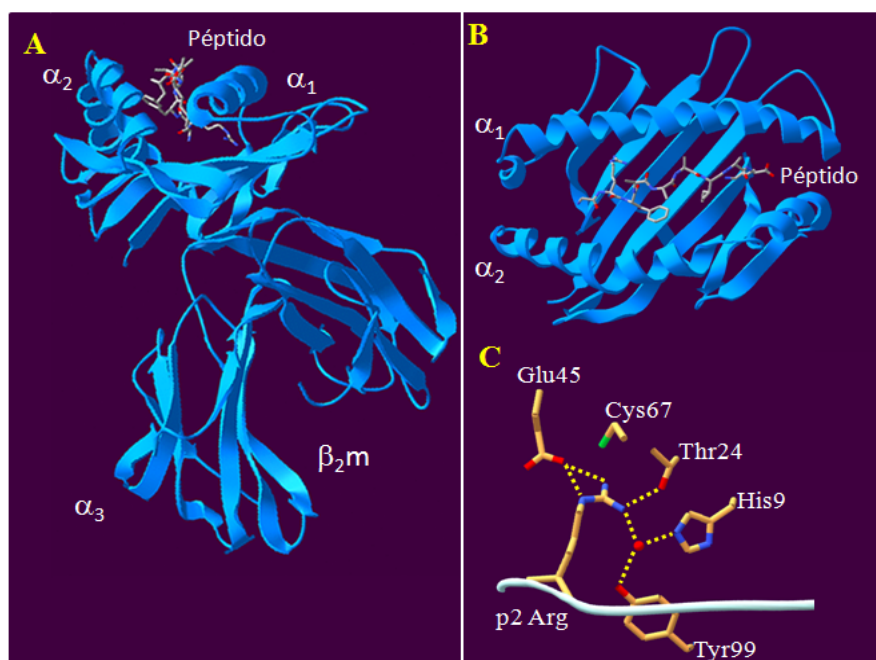


Figura 3. Características estructurales de HLA-B*27. A) Vista lateral. Se muestran los tres dominios de la cadena pesada (α_1 , α_2 y α_3), la β_2m y el péptido. B.-Vista cenital de la cavidad de unión a péptidos formado por los dominios α_1 y α_2 . C.- Residuos presentes en la subcavidad B de HLA-B*27:05 implicados en la interacción (glutámico, cisteína, treonina, histidina y tirosina) con la arginina en posición 2 del péptido. En A y B el péptido se representa de esta forma; carbonos en gris, oxígeno en rojo y nitrógeno en azul. En C el péptido se representa en blanco y las interacciones en línea discontinua amarilla (Madden *et al.*, 1992).

I.4.Vía de presentación antigénica por moléculas del MHC-I

Los ligandos naturales de las moléculas del MHC-I proceden de proteínas autólogas, que tras ser marcadas con ubiquitina al alcanzar el final de su vida útil son degradadas por el proteasoma. Otra fuente fundamental de péptidos generados por el proteasoma, son los productos defectivos de la síntesis de proteínas (DRiPs) (Yewdell *et al.*, 1996; Reits *et al.*, 2000). Esta última fuente se cree que podría constituir una ventaja en la respuesta inmune precoz ante virus cuyos productos proteicos empiezan a traducirse de forma temprana. La gran mayoría de estos péptidos son rápidamente degradados hasta aminoácidos sencillos mediante múltiples enzimas nucleares y citosólicas (Falk *et al.*, 1990; Schatz *et al.*, 2008). Aquellos que escapan a esta acción, aproximadamente 1‰ (Princiotta *et al.*, 2003), son transportados vía TAP (transportador asociado a la presentación antigénica) al interior del RE. En este compartimento los péptidos sufren un procesamiento ulterior, son cargados en las moléculas del MHC-I y finalmente los complejos pMHC-I (péptido-MHC-I) son exportados a la superficie.

I.4.1. Procesamiento proteasómico

El proteasoma es la principal proteasa encargada de la degradación de las proteínas celulares. Esta función ha sido aprovechada por el sistema inmune para proveer de péptidos antigénicos a las moléculas del MHC-I.

Es la principal enzima responsable de generar los extremos C-terminales definitivos de los ligandos del MHC-I (Dick et al., 1991; Boes et al., 1994; Eggers et al., 1995; Craiu et al., 1997a; Alvarez et al., 2001b), mientras que el extremo N-terminal suele requerir un procesamiento posterior para la generación definitiva del ligando (Craiu et al., 1997a). Su importancia sobre otras peptidasas en el aporte de ligandos es patente en experimentos de inhibición de la enzima, en los que se observa una disminución significativa de la expresión en superficie de las moléculas del MHC-I (Rock et al., 1994; Craiu et al., 1997b).

El proteasoma es un complejo multienzimático. El núcleo catalítico o proteasoma 20S es una estructura cilíndrica formada por 28 subunidades (Coux et al., 1996) distribuidas en 4 anillos apilados, con 7 subunidades en cada uno de ellos. Los 2 anillos centrales están compuestos por subunidades β (β_1 - β_7), solo 3 de las cuales presentan actividad catalítica (Groll et al., 1997; Heinemeyer et al., 1997; Arendt and Hochstrasser, 1997). Las actividades hidrolíticas se han clasificado en 3 grupos en función de la especificidad de corte: quimotríptica, tras residuos hidrofóbicos, tríptica, tras residuos básicos y caspasa, tras residuos ácidos. La actividad del proteasoma 20S se ve modificada por el complejo regulador 19S y la subunidad PA28. El elemento regulador 19S (PA700) proporciona la capacidad de degradar proteínas ubicuitinadas por el proteasoma 20S con consumo de ATP, y juntos constituyen el proteasoma 26S. La subunidad PA28 o 11S se asocia al proteasoma 20S estimulando la degradación de proteínas en ausencia de ATP (Kloetzel, 2004).

El IFN- γ induce la expresión de tres subunidades catalíticas β alternativas (β_{1i} , β_{2i} , β_{5i}) que formarán el anillo interno del que se conoce como inmunoproteasoma (Groettrup et al., 1997; Griffin et al., 1998). Estas tres subunidades se pueden expresar de forma constitutiva en células presentadoras de antígeno profesionales del timo, bazo, ganglios linfáticos y células linfoides (Stohwasser et al., 1997; Macagno et al., 1999). A su vez en el timo existe una variedad exclusiva denominada inmunoproteasoma tímico que se caracteriza por la sustitución de la subunidad β_5 del proteasoma 20S por una subunidad denominada β_{5T} (Murata et al., 2007).

I.4.2. Procesamiento no proteasómico

Algunos ligandos no requieren la acción del proteasoma para su presentación por moléculas del MHC-I (Vinitsky et al., 1997; Luckey et al., 1998; Benham et al., 1998). Esto se puso de manifiesto con el uso de inhibidores del proteasoma. Estos inhibidores tienen un efecto diferente sobre la presentación antigénica dependiendo del alotipo estudiado (Kim et al., 2009), siendo HLA-B*27 notablemente resistente su acción (Luckey et al., 2001). Por otro lado, se conocen otros sistemas proteolíticos generadores de ligandos del MHC-I independientes de la ruta clásica como son:

- 1) La peptidasa señal (Wei and Cresswell, 1992; Henderson et al., 1992).
- 2) La furina, una proproteín-convertasa residente en el aparato de Golgi que puede procesar diversos ligandos de forma independiente del proteasoma (Gil-Torregrosa et al., 1998; Gil-Torregrosa et al., 2000).
- 3) La catepsina S, una proteasa lisosomal, que es capaz de generar en células dendríticas, ligandos disponibles para ser presentados por el MHC-I (Snyder et al., 1997).

4) Las caspasas-5 y -10 se han involucrado asimismo en la generación de antígenos virales reconocidos por CTL (Lopez et al., 2011).

5) La TPPII es capaz de generar algunos antígenos que son presentados por moléculas del MHC-I (Seifert et al., 2003; Guil et al., 2006) pero no se requiere para el procesamiento postproteasómico de un gran espectro de péptidos (York et al., 2006; Marcilla et al., 2008).

I.4.3. Procesamiento postproteasómico en el citosol

Hay varias peptidasas citosólicas que afectan a la vida media de los productos de digestión del proteasoma. Una de ellas es la timet oligopeptidasa (TOP), una metalopeptidasa que produce cortes internos en péptidos de entre 6 y 17 residuos (Saric et al., 2001; York et al., 2003). También se ha descrito la bleomicín hidrolasa (BH) y la aminopeptidasa sensible a puromicina (PSA o NPEPPS), dos enzimas que pueden procesar péptidos y destruir epítomos (Stoltze et al., 2000). Recientemente se ha descrito un polimorfismo no codificante de la PSA, el rs9901869, que se asocia con un riesgo incrementado de EA (Cortes et al., 2013). Por último, la IDE (*Insuline Degrading Enzyme*) y la nardilisina son capaces de generar adicionalmente algunos extremos C-terminales de ligandos del MHC-I (Parmentier et al., 2010; Kessler et al., 2011).

I.4.4. Transporte y procesamiento final de los antígenos del MHC-I en el retículo endoplásmico

Los péptidos generados en el citosol pasan al RE por medio de TAP. Este transportador pertenece a una familia de proteínas denominadas ABC (*ATP binding cassette*) y está constituido por dos subunidades, TAP 1 y 2. TAP transporta ligandos con longitudes comprendidas entre 8 y 16 residuos de forma dependiente de ATP. La afinidad con la que TAP une los péptidos varía principalmente en función de la naturaleza del residuo C-terminal y de los tres residuos N-terminales del péptido (Momburg et al., 1994; Van Endert et al., 1995). Su importancia en la ruta de presentación antigénica del MHC-I se puso de manifiesto al ver que tras delecionar cualquiera de las subunidades la expresión en superficie de moléculas del MHC-I se veía drásticamente afectada (de la Salle et al., 1994). El impedimento más fuerte de un sustrato para ser transportado por TAP es que presente la secuencia X-Pro, donde X es cualquier aminoácido. La existencia de alotipos que presentan ligandos con Pro en posición 2 como motivo de anclaje puso de manifiesto que dichos ligandos deberían haber entrado al RE como precursores N-terminales extendidos. TAP está codificado en el MHC y, al igual que otros elementos implicados en el procesamiento y presentación antigénica, su expresión se induce por IFN- γ .

En el RE, TAP forma parte de una estructura multiproteica denominada complejo de carga, el cual está constituido por el MHC-I, diferentes chaperonas y una oxido-reductasas cuya finalidad es favorecer el plegamiento e incorporación del ligando a la molécula del MHC-I (**Figura 4**). De los ligandos translocados al RE por TAP, algunos pueden presentar el tamaño definitivo para su unión en la molécula del MHC-I, pero otros

muchos requieren de un procesamiento adicional (Schatz *et al.*, 2008). La principal enzima encargada de este procesamiento, ERAP1 (*ER aminopeptidase1*), es una aminopeptidasa que procesa péptidos con longitudes comprendidas entre 9 y 16 aminoácidos (Serwold *et al.*, 2001; Saric *et al.*, 2002; Serwold *et al.*, 2002). Esta enzima actúa de forma concertada con una proteína homóloga denominada ERAP2 (Saveanu *et al.*, 2005; Birtley *et al.*, 2012; Evnouchidou *et al.*, 2014), aunque la importancia funcional de esta última no está clara todavía.

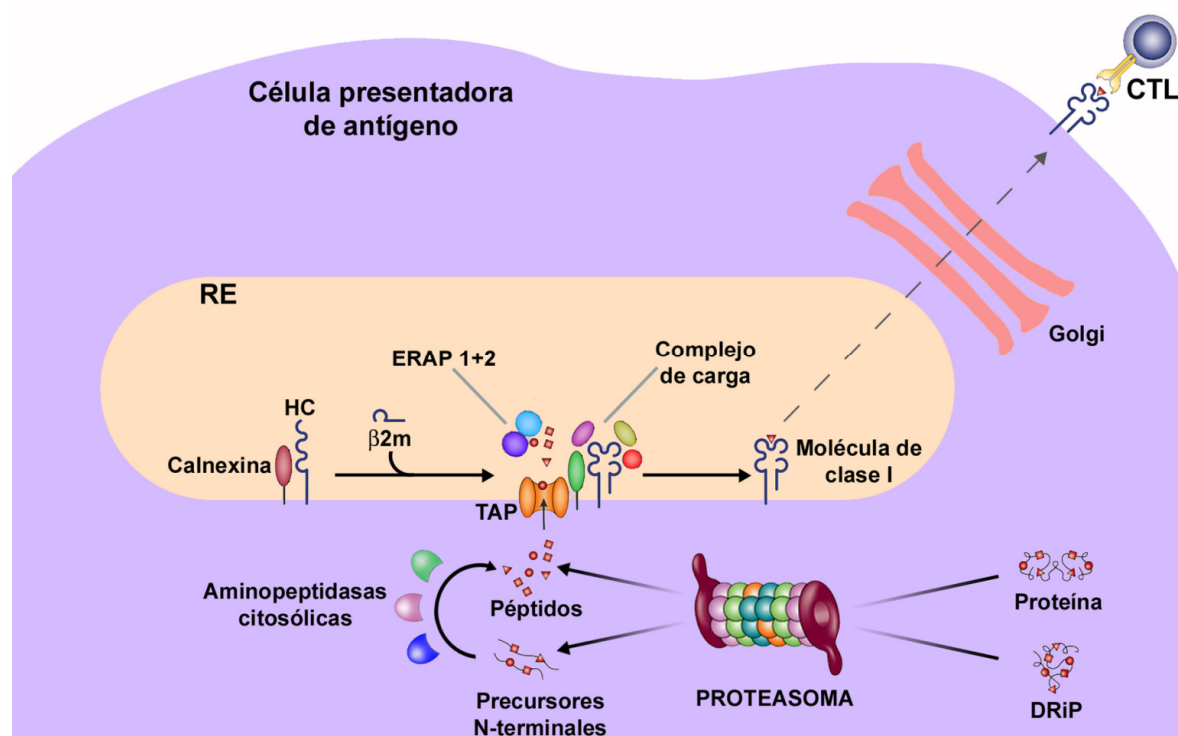


Figura 4. Ruta de procesamiento y de presentación antigénica del MHC-I. Los péptidos citosólicos generados por el proteasoma, provenientes de proteínas al final de su vida útil y DRiPs, se incorporan vía TAP (naranja) al RE. En este compartimento se produce el procesamiento definitivo de los ligandos por ERAP1 y ERAP2 (morado y azul) y se unen al MHC-I que se está plegando en un proceso asistido por chaperonas. La tapasina (verde) edita el repertorio y se encuentra asociada a la ERp57 (morada) que favorece la formación de enlaces disulfuro de la HC durante su plegamiento. Finalmente, tras adquirir el complejo pMHC-I una afinidad alta, se produce la exportación a la superficie celular.

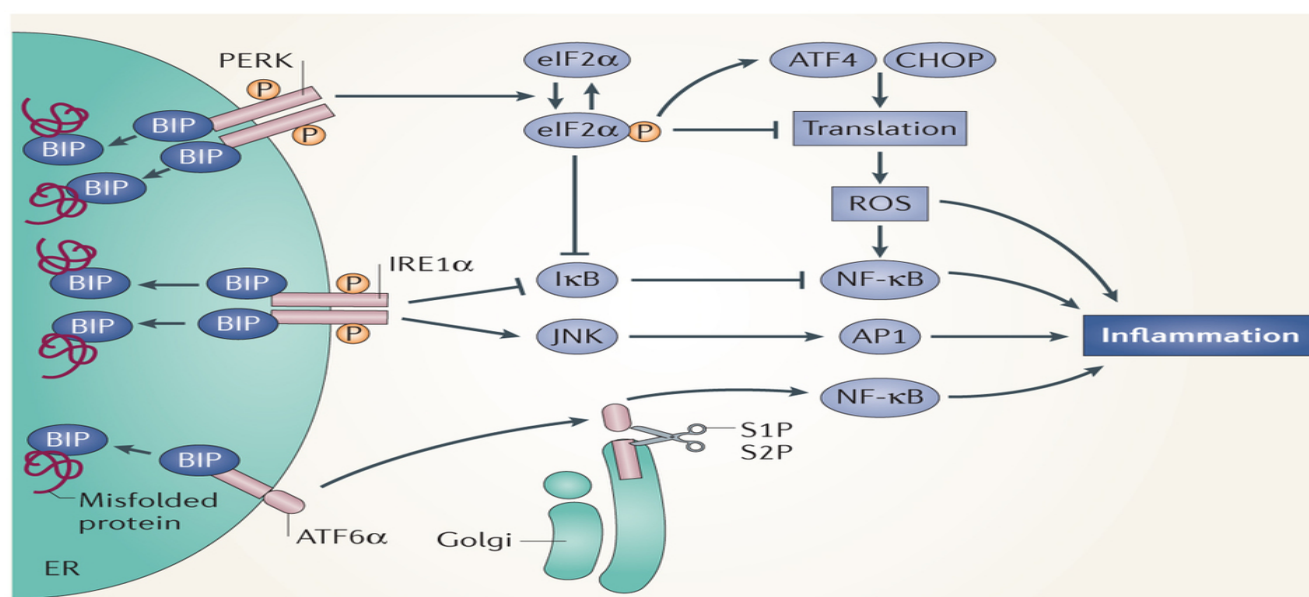
I.4.5. Ensamblaje y expresión en la membrana plasmática del complejo péptido-MHC-I

El plegamiento y estabilización de la molécula del MHC-I requieren de la unión del ligando así como un control de calidad de dicho complejo hasta que adquiere la estabilidad suficiente para abandonar el RE y expresarse en superficie.

Inicialmente la HC se introduce en el RE y sufre rápidamente la glicosilación de su extremo N-terminal por donde se asocia con la calnexina. A continuación se incorpora la $\beta 2m$ y la calnexina es reemplazada por la calreticulina, (Sadasivan *et al.*, 1996; Vassilakos *et al.*, 1996). Posteriormente la ERp57 cataliza la formación de puentes disulfuro intracatenarios durante el plegamiento del complejo pMHC-I favoreciendo la unión del ligando a la molécula (Dick *et al.*, 2002). La tapasina, una chaperona que se encuentra unida covalentemente en el

complejo de carga a la oxidoreductasa ERp57 (Wearsch and Cresswell, 2008; Vigneron et al., 2009), promueve la disociación de aquellos péptidos que no superen un umbral de afinidad dado, permitiendo que la molécula del MHC-I pueda unir ligandos con mayor afinidad (Wearsch *et al.*, 2008; Dong et al., 2009). Cuando el complejo pMHC-I adquiere la estabilidad suficiente, se disocia del complejo de carga, sufre una modificación progresiva de sus azúcares por las glicosidasas I y II y manosidasa y es transportado a través del aparato de Golgi a la membrana plasmática (Ruddock and Molinari, 2006).

Cuando el plegamiento es demasiado lento, como ocurre en HLA-B*27, la HC mal plegada se acumula en el interior del RE asociada a BiP, una proteína que se une a la cadena pesada mientras se está sintetizando para evitar su agregación y su salida prematura del RE. El aumento de BiP provoca su unión a elementos implicados en la respuesta a proteínas mal plegadas o UPR (*Unfolding Protein Response*) cuya finalidad es la eliminación de estas proteínas. Esta respuesta tiene tres efectos (**Figura 7**), 1) la expresión incrementada de chaperonas involucradas en el plegamiento de proteínas, 2) la activación de ERAD (*Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*), que es un mecanismo que implica la dislocación de proteínas mal plegadas desde RE al citosol para su degradación y 3) la detención de la síntesis proteica a nivel de los ribosomas. La activación mantenida de la UPR conduce a la activación de procesos inflamatorios y apoptosis.



Nature Reviews | Cancer

Figura 7. Las tres vías activadoras de la UPR aumentan la producción de especies reactivas de oxígeno y activan las vías de NF-κB y AP1, lo que conduce a la inflamación. NF-κB es el regulador transcripcional maestro de las vías proinflamatorias. BiP es la proteína encargada de mediar el aumento de NF-κB en las tres vías que se describen. NF-κB puede ser activado por medio de la unión al complejo IRE1α-TRAF2 producido en el RE en respuesta al estrés y que conduce a la translocación nuclear de NF-κB. Además el complejo IRE1α-TRAF2 puede reclutar la quinasa reguladora de la señal de apoptosis (ASK1) y activar JNK, lo que incrementa la expresión de genes proinflamatorios a través de una actividad incrementada de AP1. Una de las ramas de la UPR que activan la vía de NF-κB implica la asociación de PERK junto con eIF2α y la activación del factor de transcripción ATF6α. La señalización del complejo PERK-eIF2α detiene la síntesis de proteínas y aumenta la translocación al núcleo de NF-κB. En último término el plegamiento defectuoso de proteínas en el RE provoca la fosforilación de AKT y en consecuencia la activación de NF-κB.

1.5. Características generales y mecanismo de acción de ERAP1

ERAP1 es una metalopeptidasa que comparte los motivos consenso GAMEN y HEXXH(X)₁₈E de unión al Zn²⁺, esenciales para la actividad enzimática. La función de esta aminopeptidasa residente en el RE es el recorte de precursores antigénicos hasta un tamaño óptimo para su unión en las moléculas del MHC-I. Esta proteína fue descrita (Beninga et al., 1998; Serwold and Shastri, 1999; Serwold *et al.*, 2001) y posteriormente caracterizada (York et al., 2002; Saric *et al.*, 2002; Serwold *et al.*, 2002) como una enzima inducible por IFN- γ con un papel importante en la configuración del peptidoma presentado por las moléculas del MHC-I. Su influencia sobre la generación de una porción significativa del repertorio peptídico se puso de manifiesto inicialmente con el silenciamiento de ERAP1, lo que provoca una disminución de ligandos del MHC-I en torno a un 20% (aunque esta disminución es dependiente del alotipo), así como una pérdida general de la estabilidad de la molécula del MHC-I en superficie (Hammer et al., 2007). La característica más destacable de esta aminopeptidasa, y hasta la fecha exclusiva, es el mecanismo de “regla molecular” por el cual su actividad es fuertemente dependiente de la longitud del péptido, siendo capaz de digerir péptidos de 16 residuos pero incapaz de hidrolizar significativamente sustratos de 8 residuos o menores (Chang et al., 2005). Esta característica se correlaciona con el tamaño óptimo de los ligandos del MHC-I. En el estudio de (Chang et al., 2005) se observó diferente eficiencia hidrolítica no solo en función de la longitud sino también de la naturaleza del residuo C-terminal, siendo mayor con residuos hidrofóbicos. Esto puso de manifiesto la existencia de una zona reguladora diferente al centro catalítico que modula la actividad enzimática. La especificidad de corte para el residuo N-terminal se determinó por digestiones *in vitro* con sustratos fluorogénicos (Saveanu *et al.*, 2005; Goto et al., 2008) y mostró una marcada preferencia por residuos hidrofóbicos. Posteriormente se atribuyó un valor concreto de susceptibilidad al corte para cada uno de los 20 aminoácidos, para un haplotipo concreto de ERAP1 (Hearn et al., 2009). Cabe destacar que esos valores pueden variar con el polimorfismo de la enzima (Reeves et al., 2013).

La estructura de ERAP1 consta de cuatro dominios (I-IV), comprendidos entre los residuos 1-254, 255-527/529, 528/530-613/614 y 614/615-941 respectivamente (Nguyen et al., 2011; Kochan et al., 2011). En el dominio II se localiza el sitio catalítico. La molécula fue cristalizada en dos conformaciones, abierta y cerrada, lo que reveló un aspecto básico de su funcionamiento. La transición entre ambos estados depende de la rotación en torno a la región interdominio II-III, provocando que el dominio IV se cierre sobre el I. El sitio de unión de sustrato se localiza en los dominios II y IV, quedando orientado el residuo C-terminal del péptido hacia el dominio IV y el residuo N-terminal hacia el sitio catalítico en el dominio II (**Figura 5A**). La unión del péptido al sitio de unión de sustrato en ERAP1 solo es posible en la conformación abierta, sin embargo es en el estado cerrado cuando ERAP1 adquiere una configuración en la que el sitio catalítico es capaz de hidrolizar los residuos N-terminales (**Figuras 5B y 6**). Por lo tanto, el proceso de hidrólisis requeriría la acomodación inicial del péptido en el sitio de unión de sustrato o centro regulador. Posteriormente tras un cambio conformacional, en el estado cerrado, la enzima adquiriría la capacidad para la hidrolizar el residuo N-terminal. Este proceso se repetiría n veces regido por el mecanismo de regla molecular, dependiente de la longitud del sustrato (Chang *et al.*, 2005).

La monitorización de digestiones *in vitro* sugiere que el corte de ERAP1 requiere la liberación del péptido una vez cortado su residuo N-terminal para poder volver a unir e hidrolizar el sustrato (Kochan *et al.*, 2011).

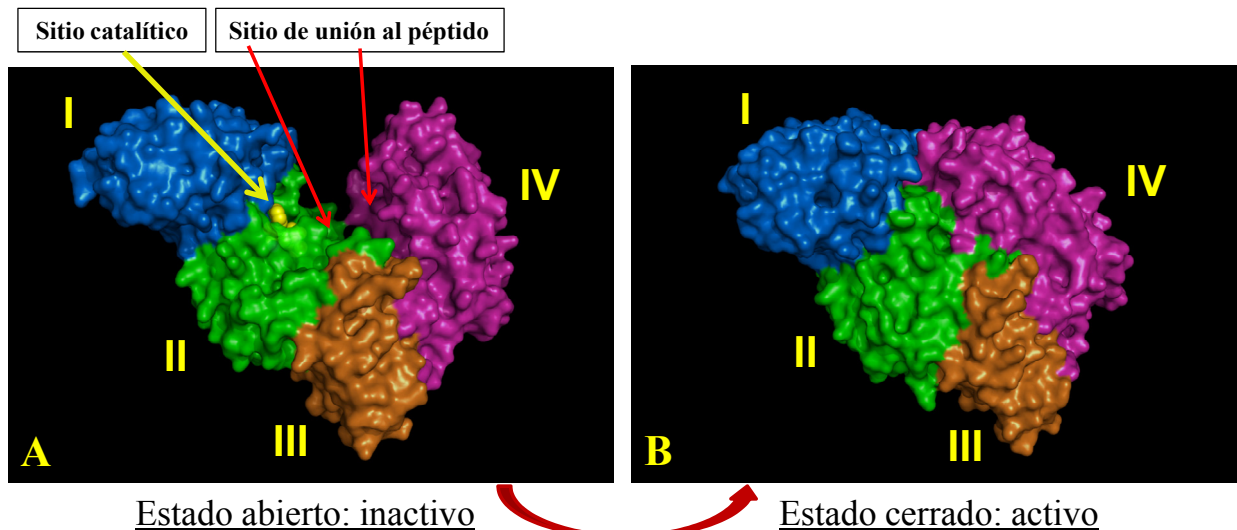


Figura 5. Estructura de ERAP1 antes y después de la transición conformacional que permite la actividad enzimática. A.- Muestra la configuración de los cuatro dominios de ERAP1 en el estado abierto. La flecha amarilla indica la posición del sitio catalítico y las flechas rojas el sitio de unión al péptido. B.- Muestra el estado cerrado tras haberse reordenado el dominio IV hacia el dominio I.(Nguyen *et al.*, 2011; Kochan *et al.*, 2011).

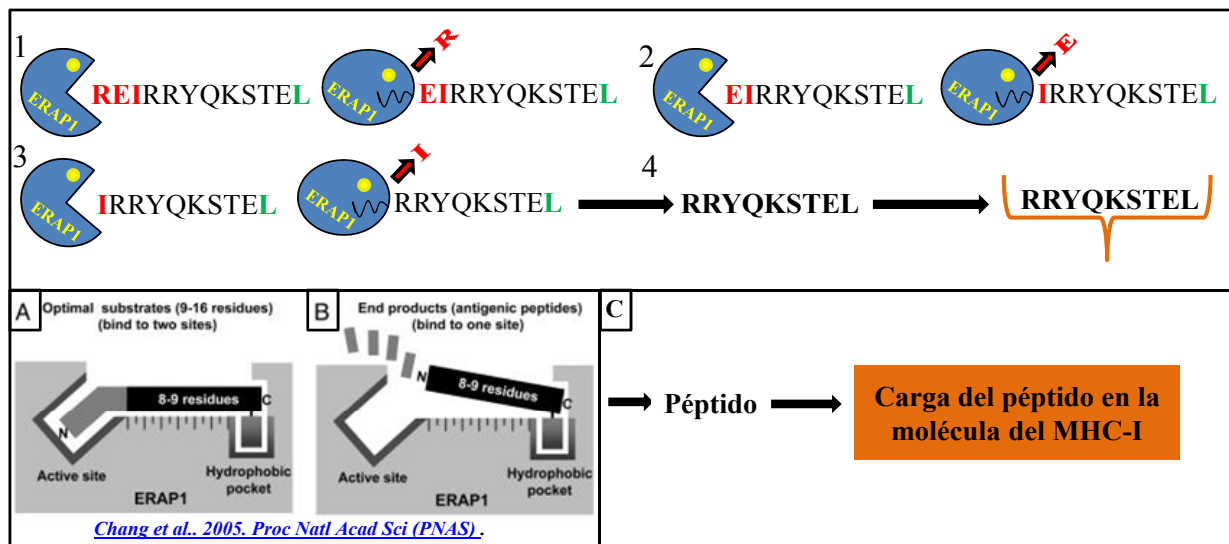


Figura 6. Procesamiento peptídico por ERAP1 y descripción del mecanismo de “regla molecular”. Panel superior.- Recorte de los residuos N-flanqueantes (rojo) del precursor del ligando RRYQKSTEL presentado por HLA-B*27. 1.- Hidrólisis del residuo de Arg. 2.- Hidrólisis del residuo de Glu. 3.- hidrólisis del residuo de Ile. 4.- Liberación del ligando (nonámero) y posterior carga en HLA-B*27. El residuo C-terminal implicado en la unión al sitio regulador de ERAP1 se muestra en verde. Panel inferior.- Muestra el proceso de recorte siguiendo el mecanismo de regla molecular definido para ERAP1. A.- Unión del precursor peptídico al sitio regulador (C-terminal) y al sitio activo (N-terminal) para su hidrólisis. B.-Impedimento estructural para continuar digiriendo el péptido. C.-Liberación final del péptido y carga en la molécula del MHC-I.

I.5.1. ERAP1 y su asociación con autoinmunidad

Gracias al desarrollo de técnicas de análisis global de marcadores genéticos en poblaciones (*genome wide associatios studies*; GWAS), se han puesto de manifiesto numerosos polimorfismos de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphism*; SNP) asociados al riesgo de padecer determinadas enfermedades, incluidas enfermedades autoinmunes o inflamatorias ligadas al MHC-I. En el caso de ERAP1, su asociación más fuerte se da con la EA. La presencia de ciertos SNP no sinónimos de ERAP1 asociados a EA en individuos HLA-B*27⁺ incrementa el riesgo de desarrollar la patología hasta un 26 % (The TASK and WTCCC2 Consortia, 2011). Asimismo se han descrito SNP de ERAP1 asociados con otras enfermedades como:

1) *Psoriasis*: es una enfermedad crónica, genéticamente compleja que afecta a la piel y se caracteriza por una hiperproliferación de la dermis, inflamación e implicación del sistema inmune innato y adaptativo. El haplotipo de ERAP1 asociado es rs27524/30187, que presenta epistasis con el alelo del MHC-I de susceptibilidad HLA-C*06:02 (Strange et al., 2010; Julia et al., 2012; Winchester et al., 2012).

2) Enfermedad de *Behçet*: es una enfermedad caracterizada por una vasculitis general, aftas bucales, úlceras genitales, uveítis y lesiones de la piel. Está asociada con la presencia del alelo HLA-B*51. Se han descrito dos SNP de ERAP1, rs10050860 y rs17482078, en epistasis con HLA-B*51, que presentan un riesgo incrementado a padecer la enfermedad.

3) *Esclerosis Múltiple*: es una enfermedad inflamatoria caracterizada por la desmielinización del sistema nervioso central por efecto de una reacción autoinmune sobre la mielina. En un estudio caso-control a gran escala se determinó que el SNP rs30187 está significativamente asociado a un riesgo incrementado de esta enfermedad (Guerini et al., 2012).

4) *Diabetes tipo I*: es una enfermedad poligénica que conduce a la destrucción de las células β productoras de insulina en el páncreas. Esta patología implica una respuesta por células B, TCD4⁺ y TCD8⁺. El componente genético más fuerte se asocia con el MHC-II. Se ha descrito una asociación del SNP rs30187 con un riesgo incrementado muy sutil a la enfermedad (Fung et al., 2009).

I.5.2. Polimorfismos de ERAP1 asociados a espondilitis anquilosante

La EA es una enfermedad con un elevado componente hereditario, tanto es así que aquellas personas HLA-B*27⁺ con antecedentes familiares tienen entre 5 y 10 veces de incremento en el riesgo a desarrollar la enfermedad. Los estudios genéticos han identificado un elevado número de genes que influyen en la susceptibilidad a EA (WTCC Consortium, 2007; Brown, 2008), entre ellos destacan ERAP1 e IL23R (receptor de la interleucina 23). ERAP1 es el segundo factor de riesgo más importante en individuos HLA-B*27⁺ (The TASK and WTCCC2 Consortia, 2011). Esta enzima es altamente polimórfica y varios SNP no sinónimos, que codifican cambios en la secuencia de aminoácidos (**Tabla II**), influyen en la protección o susceptibilidad a EA (WTCC Consortium, 2007). Estas asociaciones han sido replicadas en múltiples poblaciones, poniendo de manifiesto la

importancia geo-epidemiológica de la asociación de ERAP1 con EA (Brown, 2008; Harvey et al., 2009b; Reveille et al., 2010; Choi et al., 2010; Lin et al., 2012; Wang et al., 2012).

Debido al desequilibrio de ligamiento entre varios polimorfismos, su asociación se manifiesta de manera conjunta. Por lo tanto es más apropiado hablar de haplotipos de ERAP1 asociados a EA (Maksymowych et al., 2009; Szczypiorska et al., 2011). En análisis condicionales en los que se analiza la asociación de un SNP controlando por el efecto de los otros polimorfismos en desequilibrio de ligamiento, se determinó que la asociación de ERAP1 a EA se ajusta a un modelo de dos mutaciones. El efecto más importante lo aporta rs30187 y después el doblete rs10050860/rs17482078. Traducido a aminoácidos, R528 y N575/Q725 confieren protección (The TASK and WTCCC2 Consortia, 2011). El efecto es tal, que individuos homocigotos para ambos polimorfismos protectores tienen un riesgo entre un 25 y 30% más bajo de desarrollar EA que los homocigotos para ambos alelos de susceptibilidad (The TASK and WTCCC2 Consortia, 2011). Estas mutaciones implican una pérdida de la actividad de la enzima que contrasta con la mayor actividad de la mutación K528. A su vez la mutación K528 está en desequilibrio de ligamiento con otra que provoca una mayor cantidad de RNA mensajero, conduciendo a un mayor grado de expresión de las variantes de ERAP1 con este residuo (Harvey *et al.*, 2009b).

I.5.3. Efecto de los polimorfismos de ERAP1 sobre su actividad enzimática

Los primeros estudios que permitieron caracterizar la actividad de ERAP1 se realizaron *in vitro* con diferentes variantes de la enzima y sustratos fluorogénicos. El primer efecto descrito de un SNP asociado a EA sobre la actividad enzimática fue con rs30187 (K528R). La variante K528 presenta una actividad elevada con respecto a R528 (Goto et al., 2006) (**Tabla II**). En el mismo estudio no se vieron efectos de los polimorfismos P127R, D575N y Q730E sobre la actividad. En trabajos posteriores se observó el mismo efecto asociado a K528R y la ausencia de efecto de D575N (The TASK and WTCCC2 Consortia, 2011; Evnouchidou et al., 2011; Kochan *et al.*, 2011). Sin embargo, otros estudios sí vieron efectos en la actividad enzimática asociados a la posición 575 (Reeves et al., 2013; Martin-Esteban et al., 2014). Además los polimorfismos Q725R y Q730E también tienen un efecto sobre dicha actividad (The TASK and WTCCC2 Consortia, 2011; Evnouchidou *et al.*, 2011; Reeves *et al.*, 2013). Para las posiciones, P127R, G346D y M349V no se ha descrito ningún efecto. Adicionalmente, el polimorfismo en la posición 181 de la enzima afecta notablemente la actividad por medio de un cambio en la afinidad alterando el sitio de unión a sustrato (Goto *et al.*, 2008), aunque la asociación de este polimorfismo con la EA no ha sido analizada.

Los efectos de los polimorfismos de ERAP1 sobre la actividad enzimática pueden ser a tres niveles: 1) alterando el sitio catalítico, M349V, 2) alterando el sitio de unión a sustrato, G346D, Q725R, E730Q y 3) afectando a la reorganización de los dominios implicados en la transición del estado abierto y cerrado, R528K, D575N.

La magnitud de los efectos del polimorfismo de ERAP1 sobre la actividad enzimática y su asociación a EA en epistasis con HLA-B*27 sugieren que el papel patogénico de ERAP1 en la enfermedad se debe a su

interacción funcional con HLA-B*27 y, concretamente, a su acción sobre el peptidoma de esta molécula. La caracterización de tales efectos es el propósito fundamental de esta Tesis.

SNP	Mutación/Residuo	Dominio	Efecto sobre la actividad enzimática	Referencias
rs27895	G346D	II	n.d.	
rs26618	I276M	II	Sin efecto	1
rs26653	R127P	I	Sin efecto	1
rs2287987	M349V	II	Sin efecto	5
rs30187	K528R	Bisagra II-III	Disminución	1, 2, 3
rs10050860	D575N	III	Incrementado (<i>in vitro</i>)/ Sin efecto	1, 2, 4, 5
rs17482078	R725Q	IV	Disminución	2
rs27044	Q730E	IV	Incrementado*	3, 5

Tabla II. Descripción de los efectos de las mutaciones de ERAP1 sobre su actividad enzimática en el contexto de la EA. En rojo las mutaciones asociadas con aumento de riesgo a EA y en verde las mutaciones protectoras. Referencias: 1 (Goto *et al.*, 2006), 2 (The TASK and WTCCC2 Consortia, 2011), 3 (Evnouchidou *et al.*, 2011), 4 (Martin-Esteban *et al.*, 2014) y 5 (Reeves *et al.*, 2013). * La actividad relativa de las variantes de ERAP1 con Q730 o E730 podría depender de la longitud del ligandos (Efstratos Stratikos, comunicación personal).

Objetivos

El **objetivo general** de esta Tesis es definir las bases moleculares de la interacción funcional entre HLA-B*27 y ERAP1 y, concretamente, determinar los efectos y mecanismos de acción de los polimorfismos de ERAP1 asociados a EA sobre el peptidoma de HLA-B27.

Los objetivos específicos son los siguientes:

- 1) Describir el efecto y el mecanismo de acción de los polimorfismos de ERAP1 asociados a EA sobre el peptidoma de HLA-B*27:04.
- 2) Describir el efecto y el mecanismo de acción de los polimorfismos de ERAP1 asociados a EA sobre el peptidoma de HLA-B*27:05.
- 3) Describir el efecto y el mecanismo de acción de ERAP1 sobre los subtipos de HLA-B*27 asociados diferencialmente a EA.

Materialles y Métodos

M.1. Líneas celulares y anticuerpos monoclonales

HMy2.C1R es una línea linfoide B humana que presenta baja expresión de sus antígenos de histocompatibilidad HLA-C*04 y HLA-B*35:03 (Zemmour et al., 1992). Los transfectantes de esta línea utilizados se describen en la **Tabla III**. Además se utilizaron otras líneas linfoblastoides (LCL), que se detallan en la **Tabla IV**. Todas estas líneas celulares fueron genotipadas para los SNP más importantes de ERAP1 y ERAP2 en el contexto de la EA (**Tabla V**).

El anticuerpo monoclonal de uso mayoritario fue ME1. Este es una IgG1 que reconoce específicamente HLA-B*27, B*7 y B*22 (Ellis et al., 1982). En menor medida se utilizó W6/32, una IgG2a que reconoce específicamente un determinante monomórfico de HLA-A, B y C en su conformación nativa (Barnstable et al., 1978).

Línea celular	Alotipo	Referencia
HMy2.C1R	B*27:02	(Calvo et al., 1990)
	B*27:04	(Garcia et al., 1997)
	B*27:05	(Calvo et al., 1990)
	B*27:06	(Rojo et al., 1993)
	B*27:07	(Gomez et al., 2006)
	B*27:09	(Ramos et al., 2002)
	A*68:01	(Luckey et al., 2001)

Tabla III. Transfectantes para diferentes loci de HLA en C1R.

LCLs	HLA-A	HLA-B	HLA-C
KNE	01,02	B*27:04	
JSL	11	B*27:04,48	02
Wewak-I (We-I)	11,24	B*27:04,68	02,04
LG2	02	B*27:05	01
P50	23,24	B*27:05,14	02,08

Tabla IV. Tipaje de los loci del MHC-I clásicos en las líneas celulares utilizadas.

SNP	Exón	Nucl. / aa	Consenso	LG2	C1R	P50	We-I	JSL	KNE
ERAP1									
rs26653	2	380 / 127	g / R	g / R	c / P	c / P	c / P	g / R	g,c / R,P
rs26618	5	828 / 276	a / I	a / I	g / M	a / I	a / I	a / I	a,g / I, M
rs27895	6	1037 / 346	g / G	g / G	g / G	g / G	g / G	g / G	g ,a/ G,D
rs2287987	6	1045 / 349	a / M	a / M	a / M	g / V	g / V	a / M	a / M
rs30187	11	1583 / 528	a / K	a / K	g / R	g /R	g /R	a / K	g / R
rs10050860	12	1723 / 575	g / D	g / D	g / D	a / N	a / N	g / D	g / D
rs17482078	15	2174 / 725	g / R	g / R	g / R	a / Q	a / Q	g / R	g / R
rs27044	15	2188 / 730	c / Q	g / E	g / E	g / E	g / E	c / Q	g / E
ERAP2									
rs2549782	7	1176 / 392	g / K	g / K	g / K	g,t / K,N	g,t / K,N	t / N	g,t / K,N
	Intrón								
rs2248374	11		a	a	a	a,g	n.d	n.d	n.d

Tabla V. Tipaje de los SNP de ERAP1 y ERAP2 más destacables asociados a EA. Rs2549782 (t) y rs2248374 (g), se encuentran en desequilibrio de ligamiento, y se asocian a la no expresión de la variante de ERAP2 N392. Nucl: nucleótido, aa: aminoácido. n.d: no disponible.

M.2. Aislamiento y purificación de péptidos unidos a HLA-B*27

Los ligandos de HLA-B*27 se obtuvieron de la lisis de 10^{10} células en tampón TRIS 20 mM, NaCl 150 mM, Igepal CA-630 1%, pH= 7.5 en presencia de inhibidores de proteasas (cóctel Roche y PMSF) durante 2 horas a 4 °C (Paradela et al., 1998). La mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 1000 x g, recuperándose el sobrenadante que fue sometido a una ultracentrifugación durante 1 hora a 100.000 x g. Para eliminar impurezas residuales y elementos inespecíficos, el sobrenadante se pasó por una columna de sefarosa activada con BrCN empaquetada en un tampón Tris 20 mM, NaCl 150 mM y pH= 7.5. A continuación, la muestra se pasó por una columna de sefarosa acoplada con ME1 y se realizaron lavados con volúmenes de 0.5-1 litro de tampón. La disociación de complejos HLA-péptido se realizó a temperatura ambiente en TFA 0.1%. Los péptidos se aislaron por centrifugación con filtrado molecular de 3000 Da (Amicon, Beverly, MA) o 5000 Da (Vivaspin2 hidrosart VS02H11 Sartorius stedim biotech, Gottingen Germany), se concentraron y fueron separados por cromatografía en fase reversa por HPLC en un modulo de separación Waters Alliance (Waters, Milfod, MA mediante una columna Vydac C₁₈ (0.21 X 25 cm) con un tamaño de poro de 5 µm (Vydac, Hesperia, CA). Se utilizó un flujo constante de 0.1 ml/minuto (Paradela et al., 2000) y un gradiente consistente en condiciones isocráticas de solvente A (TFA 0.08%) durante 10 minutos, un incremento lineal de 0 a 44% de solvente B (acetonitrilo 80%, TFA 0.075%) durante 90 minutos y posteriormente un incremento del 44 al 100% del solvente B durante 35 minutos. La cromatografía se monitorizó midiendo la absorbancia a 210 y 280 nm. Se recogieron fracciones de 50 µl desde el minuto 40 hasta el 115 del gradiente y se guardaron a -20 °C para su análisis posterior.

M.3. Espectrometría de Masas (MS)

Las fracciones de HPLC recogidas se secaron por vacío en *speedVac* y se resuspendieron en 0.6 µl del solvente TA consistente en 30% acetonitrilo, 15% isopropanol y 0.1% TFA. Las muestras se sonicaron durante 3 minutos y se cargaron en una placa Optiplex de 384 *spots*, se añadieron 0.5 µL de α -ciano-4-hidroxicinámico 3 mg/mL resuspendido en TA y se analizaron en un equipo MALDI-TOF/TOF 4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) empleando el software Data Explorer 4.9. La adquisición de datos se llevó a cabo en modo reflector positivo a 25 KV, en el rango de masa de 800-2000 Da.

M.3.1. Fragmentación por MS/MS MALDI-TOF/TOF

La fragmentación de las masas de interés se llevó a cabo por disociación inducida por colisión con aire atmosférico a 1 KV y con una ventana de masa del precursor de ± 2.5 Da. Los espectros de fragmentación se adquirieron con el software Data Explorer 4.9 con una relación señal/ruido de 3. La interpretación de los espectros de fragmentación se realizó de forma manual y asistida por herramientas informáticas implementadas en Excel. Los datos preliminares se lanzaron a motores de búsqueda para la entrega de secuencias candidatas que se ajusten al espectro de fragmentación. La búsqueda de coincidencias se lanzó frente a la base de datos Uniprot/Swissprot 14.0 (Julio 2008; 19329 entradas) mediante el software Mascot 2.2 (Matrix Science Inc. Boston, USA; www.matrixscience.com), restringiendo la búsqueda al proteoma humano y con un intervalo de confianza de ± 0.5 para el valor de m/z (relación masa/carga) del precursor y los fragmentos iónicos. Las secuencias candidatas se sometieron a fragmentación teórica mediante la herramienta MS-Product 5.1.8 (University of California, San Francisco, USA; <http://prospector.ucsf.edu>) y se comparó la lista de masas de los fragmentos teóricos con las especies iónicas del espectro de fragmentación para su validación.

M.4. Caracterización de variantes naturales del gen de ERAP1 y ERAP2 en líneas celulares

Todas las líneas celulares empleadas fueron genotipadas para los principales polimorfismos de ERAP1 y ERAP2 relevantes en la EA y también se analizó el nivel de expresión de proteína de dichas variantes.

M.4.1. Tipaje de SNP no sinónimos

Para la purificación de DNA se empleó el sistema High Pure PCR Template Preparation (Roche Diagnostics, Barcelona) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron alícuotas de 10 ng a una placa de 384 pocillos por duplicado, se secó y se amplificó usando oligonucleótidos específicos para ocho SNP no sinónimos localizados en la secuencia codificante de ERAP1: rs6653, rs26618, rs27895, rs27044, rs30187, rs17482078 y rs2287987. Las muestras fueron corridas en un sistema HT7900 Fast real-Time PCR y se

genotiparon empleando el software SDS2.2 (ambos de Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA) para discriminación alélica. El SNP no sinónimo de ERAP2; rs2549782 (G/T) que codifica para el aminoácido en la posición 392 (Lys/Arg) fue tipado siguiendo el mismo procedimiento.

M.4.2. Secuenciación genómica

Se amplificaron los exones 2-20 de la región codificante de ERAP1 por PCR y se clonaron en el plásmido M13. Los productos de PCR se generaron utilizando AmpliTaq Gold Master Mix (Applied Biosystems) siguiendo procedimientos estándar. Los productos de amplificación se purificaron usando ExoSap (USB Corp., Cleveland, OH) y se secuenciaron en un dispositivo 3730XL (Applied Biosystems). Los iniciadores empleados para la secuenciación fueron oligonucleótidos complementarios de M13 para los amplicones que incluían esta extensión en la secuencia de ERAP1, o los propios iniciadores específicos cuando no incluían secuencias derivadas de M13. Las regiones que incluyen dos SNP no sinónimos de ERAP2, rs2549782 que codifica para el aminoácido 392 y rs2248374 que provoca la degradación del mensajero por NMD (*Nonsense-Mediated Decay*) (Andres et al., 2010), fueron secuenciadas siguiendo el mismo procedimiento experimental que para ERAP1.

M.4.3. Análisis de la expresión de proteína por Western blot

Se lisaron 5×10^5 células en Igepal 0.5% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), Tris HCl 50 mM, pH= 7.4, $MgCl_2$ 5 mM en presencia de inhibidores de proteasas (Complete Mini, Roche) durante 30 minutos a 4 °C con agitación. Después de centrifugar la muestra 10 minutos y tras añadir tampón de carga, los sobrenadantes se sometieron a separación electroforética en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras a 80 V durante una hora y 20 minutos a 4 °C. Las proteínas se trasladaron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham, Hybond-ECL, GE Healthcare, UK) por electrotransferencia a 20 V durante una noche usando una solución de metanol 30% en Tris/glicina 50 mM, pH 8.8, SDS 0.04%. ERAP1, ERAP2 y γ -tubulina fueron revelados con el anticuerpo monoclonal 6H9 proporcionado por el Dr. Peter van Endert (INSERM, Paris, Francia), el anticuerpo 3F5 (R&D Systems, Minneapolis, MN) y GTU88 (Sigma-Aldrich), respectivamente usando un anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca). Las películas autoradiográficas se cuantificaron con el software de análisis de imagen TINA 2.09 (Raytest Isotopenmessgerate, Straubenhardt, Alemania).

M.5. Análisis comparativo de los niveles de expresión de ligandos de HLA-B*27

La expresión diferencial de ligandos compartidos entre diferentes LCL se analizó como se detalla a continuación. Para que dos péptidos fueran considerados como compartidos tuvieron que cumplir dos requisitos: poseer una diferencia de masa de ± 0.2 Da y haber eluido en HPLC en un margen de ± 1 fracción. Para detectar diferencias en los patrones de expresión de los repertorios peptídicos entre las líneas celulares estudiadas

comparadas dos a dos, se establecieron tres subconjuntos en función de la relación de intensidades (RI), que viene dada por el cociente de intensidades obtenido por MALDI-TOF de los péptidos compartidos entre dos LCL:

RI>3: Se comparó la población de péptidos que presentaban al menos tres veces más intensidad en una línea celular contra los que presentaban la misma diferencia de intensidad en la otra línea. Este conjunto representa las poblaciones de péptidos que son considerablemente más abundantes en una línea con respecto a otra y en el que los efectos de las variantes naturales de ERAP1 se manifiestan más netamente.

RI>1.5-3: Se comparó la población de péptidos que presentaban entre 1.5 y 3 veces más intensidad en una línea contra los que presentaban la misma diferencia de intensidad en la otra línea. Este conjunto de péptidos mostró generalmente una tendencia más atenuada en los patrones diferenciales observados en los subconjuntos RI>3.

RI>1-1.5: Se comparó la población de péptidos con una expresión similar en las líneas celulares comparadas. Este subconjunto de péptidos fue, de forma general, el más abundante.

M.6. Susceptibilidad diferencial de los residuos N-terminales a la hidrólisis por ERAP1

La susceptibilidad de los residuos flanqueantes (P-2, P-1) y N-terminal (P1) de los ligandos naturales a la hidrólisis por ERAP1 se estableció mediante la asignación de una puntuación a cada aminoácido que va desde 0 a 100, basada en un trabajo previo (Hearn et al., 2009). Estos autores midieron la expresión en superficie del péptido SIINFEKEL procedente de precursores XX-SIINFEKEL expresados en el RE. Se relativizaron los valores de expresión al aminoácido con mayor susceptibilidad al corte que fue Tyr (valor 100), y por otro lado el valor más bajo (0) fue para Pro y cualquier residuo que precede a la Pro, por la incapacidad de ERAP1 para hidrolizar estos residuos. El resto de valores queda reflejado en la **Tabla VI**.

La comparación de susceptibilidad global de los residuos en P-2, P-1 y P1 en la hidrólisis por ERAP1 en dos líneas celulares se efectuó de dos maneras:

- 1) La media de los valores de susceptibilidad por residuo en una posición dada para una línea celular dividida entre la media de la otra línea celular.
- 2) Como la frecuencia de aparición de residuos en tres categorías establecidas en función de la susceptibilidad: susceptibilidad alta (valores >50: Y, M, L, A and C), media (valores <50>10: F, S, T, G, I, H, N y Q) y baja (valores <10: E, D, V, W, K, R y P).

M.7. Contribución de la secuencia del ligando a la hidrólisis de los residuos por ERAP1

La influencia de la secuencia interna y del residuo C-terminal sobre la hidrólisis de sustratos se analizó en base a una estimación publicada previamente (Evnouchidou et al., 2008) en el que se utilizó una librería de nonámeros para evaluar *in vitro* la influencia de los diferentes residuos, en cada posición del péptido, con

respecto a la hidrólisis de P-1. Se evaluó el porcentaje de nonámeros digerido en función de cada variante de la secuencia interna estudiada. En dicho trabajo no todos los residuos fueron probados para cada posición, por lo que en las series de ligandos secuenciados en esta Tesis para los que no hubiera un valor asignable no se les atribuyó ningún valor. Finalmente, dado que la gran mayoría de ligandos de HLA-B*27 presentan arginina en P2, la asignación de valores para los ligandos secuenciados se hizo desde P3 hasta P9 (**Tabla VI**).

M.8. Ensayos de termoestabilidad

Estos ensayos se llevaron a cabo por un procedimiento descrito previamente (Merino et al., 2008); de forma resumida, se marcaron las células durante 15 minutos con ^{35}S -Met y se realizaron cazas a varios tiempos. En cada tiempo de caza los lisados celulares se incubaron 1h a varias temperaturas, se inmunoprecipitaron con ME1 y HC10 y se analizaron por SDS-PAGE. La cantidad de heterodímero precipitado a cada temperatura se determinó por autoradiografía, se expresó como porcentaje relativo a la cantidad precipitada a 4 °C y se representó en función de la temperatura.

M.9. Cálculo de las afinidades de los péptidos por el MHC-I y de sus diferencias estadísticas

El cálculo de las afinidades se realizó solo para nonámeros, debido a que es la población mayoritaria presentada por las moléculas del MHC-I y a su vez la fracción de secuencias más abundante obtenida en este trabajo. La afinidad se calculó *in silico* utilizando los algoritmos (Karosiene et al., 2012) disponibles en la web *CBS Prediction Servers* (NetMHCcons). El test estadístico escogido para evaluar las diferencias de afinidad fue la U de Mann Whitney. Su elección se debe al conjunto reducido de datos a estudiar, así como la falta de una distribución normal de ambos conjuntos de datos. El valor estadístico se calcula teniendo en cuenta el número de muestras y dónde se sitúa la mediana. El nivel de significación estadística se fijó en valores de $p < 0.05$.

Contribución relativa de cada residuo en función de la posición en el ligando								
	P-2, P-1 y P1	Otros residuos						
Residuos	Valor	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
P	0	2.5	0	0	4	0	0.5	1
R	4					2.5		8.5
K	4	4	2.5	2	2	1	5.5	
V	5	4	2	0		0	1	6
D	5							
W	8							
E	8	1.5	0	0	0.5	0	0	
N	13							
T	19	4	0.5		4	0	1	
G	20	4	0	0	4	0	1	
H	20							
Q	22	5	1.5	0	2.5	0	1	1
S	32							
F	34	2	3.5	2.5	7	2.5	0.5	6
I	47							
C	55							
A	76						1	
L	88							
M	91	6	1.5	0	8		1.5	4
Y	100							

Tabla VI. Contribución relativa de los residuos N-terminales, la secuencia interna y del residuo C-terminal a la hidrólisis por ERAP1. La parte izquierda muestra la susceptibilidad relativa de los residuos N-terminales a la hidrólisis por ERAP1 (Hearn *et al.*, 2009). La parte derecha muestra la contribución relativa a la susceptibilidad de la hidrólisis N-terminal por ERAP1 de los residuos en una posición interna o C-terminal del péptido (Evnouchidou *et al.*, 2008).

RESULTADOS

EFFECTO DEL POLIMORFISMO DE ERAP1 SOBRE EL PEPTIDOMA DE HLA-B*27

R.1. Efecto del polimorfismo de ERAP1 sobre el peptidoma de HLA-B*27:04

Se realizó un estudio de peptidómica comparativa en líneas celulares HLA-B*27:04⁺ con diferentes variantes alélicas de ERAP1 para estudiar sus efectos sobre los niveles de expresión de sus ligandos. Las comparaciones se realizaron por pares de líneas celulares: JSL/We-I, We-I/C1R-B*27:04 (C1R04) y C1R04/KNE. Estas líneas celulares presentaban diferentes polimorfismos con distintos grados de asociación a EA (Tabla VII).

R.1.1. Caracterización de ERAP1 y ERAP2 en líneas celulares HLA-B*27:04⁺

El análisis de la secuencia codificante de ERAP1 en las cuatro líneas celulares mostró que JSL expresa un haplotipo que incluye seis polimorfismos asociados a un riesgo incrementado de EA, mientras que We-I expresa una variante con los polimorfismos protectores para esas mismas seis posiciones. Ambas líneas fueron homocigotas en todas las posiciones. C1R04, presentó un patrón de polimorfismos intermedio entre las dos líneas anteriores. KNE, presentó esencialmente el mismo patrón que C1R04, excepto tres heterocigosis en las posiciones 127, 276 y 346. De las cuatro líneas celulares, C1R expresa en homocigosis la misma variante de ERAP2 para el polimorfismo en la posición 392 (K392). KNE y We-I fueron heterocigotas para dicha posición y JSL fue homocigota para el polimorfismo contrario (N392). El polimorfismo de ERAP2 que codifica para la N392 está en desequilibrio de ligamiento con un SNP que impide la expresión de la proteína por NMD (Andres et al., 2010).

SNP ERAP1	Posición (Nucl./aa)	Consenso	Odds Ratio	JSL	C1R	KNE	We-I
<i>rs26653</i>	380 / 127	g / R*	1.30 (Harvey <i>et al.</i> , 2009b)	g / R*	c / P	g,c / R*,P	c / P
<i>rs26618</i>	828 / 276	a / I	0.99 (Harvey <i>et al.</i> , 2009b)	a / I	g / M	a,g / I,M	a / I
<i>rs27895</i>	1037 / 346	g / G	1.07 (Harvey <i>et al.</i> , 2009b)	g / G	g / G	g,a / G,D	g / G
<i>rs2287987</i>	1045 / 349	a / M*	0.71 (Brown, 2008)	a / M*	a / M*	a / M*	g / V
<i>rs30187</i>	1583 / 528	a / K*	1.40 (Brown, 2008)	a / K*	g / R	g / R	g / R
<i>rs10050860</i>	1723 / 575	g / D*	0.71 (Brown, 2008)	g / D*	g / D*	g / D*	a / N
<i>rs17482078</i>	2174 / 725	g / R*	0.70 (Brown, 2008)	g / R*	g / R*	g / R*	a / Q
<i>rs27044</i>	2188 / 730	c / Q*	1.40 (Brown, 2008)	c / Q*	g / E	g / E	g / E
ERAP2							
<i>rs2549782</i>	1176 / 392	g / K		t / N	g / K	g,t / K,N	g,t / K,N

Tabla VII. Polimorfismos de ERAP1 y ERAP2 en líneas celulares HLA-B*27:04⁺. Solamente se muestran los cambios de base no sinónimos correspondientes a la hebra codificante del DNA. Los cambios de base asociados al riesgo de EA aparecen marcados con asteriscos, y los que implican variaciones con respecto a la secuencia consenso (Num. Acceso para ERAP1 Q9NZ08-2 y para ERAP2 Q6P179-1), están señalados en negrita. Nucl: nucleótido, aa: aminoácido.

Los niveles de expresión de proteína de ERAP1 y ERAP2 se determinaron por Western Blot (**Figura 8**). Durante el transcurso de los experimentos la línea JSL se extinguió por lo que no se pudieron obtener datos fiables de sus niveles de expresión. Sin embargo es probable que la expresión de ERAP1 fuera más alta que en las otras tres líneas celulares, debido a que K528 está en desequilibrio de ligamiento con un polimorfismo que aumenta la expresión de la proteína (Harvey et al., 2009a). Asimismo debido a su homocigosis para un polimorfismo de ERAP2 (N392) que está en desequilibrio de ligamiento con otro polimorfismo que impide la no expresión de la proteína, esperaríamos que no expresara ERAP2.

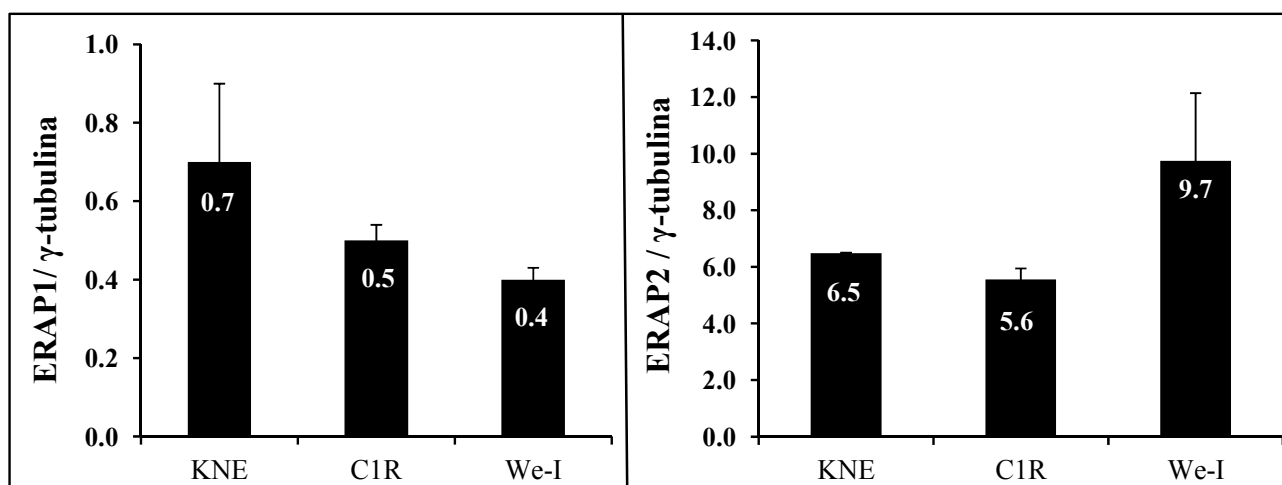


Figura 8. Expresión de ERAP1 y ERAP2 relativizada al nivel de γ -tubulina para cada línea celular. El panel izquierdo muestra el nivel de proteína de ERAP1 revelado con peroxidasa tras el reconocimiento del mAb 6H9 anti-ERAP1. El panel derecho muestra el nivel de proteína de ERAP2 revelado con peroxidasa tras reconocer el anticuerpo 3F5 anti-ERAP2.

R.1.2. Análisis comparativo de la expresión de ligandos de HLA-B*27:04

Para evaluar el efecto de ERAP1 sobre la configuración del repertorio peptídico de HLA-B*27:04, se realizó un análisis comparativo por espectrometría de masas de los peptidomas obtenidos en dos líneas celulares dadas. Este análisis, realizado por MALDI-TOF, se llevó a cabo para caracterizar los patrones de expresión de los péptidos en diferentes contextos de ERAP1. El estudio se centró en los ligandos compartidos debido a que la técnica empleada no permite establecer formalmente la ausencia real de un ligando en una mezcla compleja.

Los peptidomas fueron fraccionados por HPLC. Las fracciones cromatográficas se analizaron individualmente por MALDI-TOF MS y los espectros se adquirieron en un rango m/z de 800-2000 Da y una relación señal-ruido de 3. Los espectros para cada línea celular se compararon de la siguiente manera: We-I/JSL, We-I/C1R04 y C1R04/KNE con un umbral de intensidad mínimo de 200, salvo en la última comparación que fue de 300. Las dos primeras comparaciones permiten evaluar el efecto sobre el peptidoma de HLA-B*27:04 de contextos de ERAP1 con patrones de polimorfismo distintos en relación a la EA. La tercera comparación con dos variantes de ERAP1 muy similares, se empleó como control.

Las comparaciones se llevaron a cabo utilizando los siguientes filtros implementados en la herramienta

informática *MSHandler* (Garcia-Medel et al., 2012) : rango de masas entre 850 y 1700 Da, tolerancia en masa de ± 0.2 Da, tolerancia de tiempo de retención cromatográfica de ± 1 fracción de elución, eliminación de masas incompatibles (rango decimal 0.9, 0.1, 0.2) y eliminación de señales de matriz. Una vez obtenidas las listas de péptidos alineadas y con las intensidades asociadas a cada ion, se calculó la RI entre las señales compartidas como el cociente de sus intensidades en las dos líneas celulares comparadas.

Para poner de manifiesto diferentes subconjuntos de ligandos que pudieran mostrar cambios de expresión, los péptidos compartidos se clasificaron en tres grupos atendiendo a su RI, $RI > 1.5$; $RI > 1.5-3.0$ y $RI > 3.0$. Puesto que el MALDI-TOF no es cuantitativo, estas subdivisiones muestran las tendencias globales en relación a la expresión relativa de los péptidos de una línea celular con respecto a otra.

Si el polimorfismo de ERAP1 tiene un efecto sobre el peptidoma de HLA-B*27:04, dicho efecto debe ser más evidente al comparar los conjuntos de péptidos que presenten las mayores diferencias de intensidad relativa entre dos líneas celulares. Por tanto, se analizó la distribución de pesos moleculares de los péptidos para cada rango de RI en cada comparación, para definir efectos dependientes del nivel de expresión relativa de los ligandos. Puesto que dicha distribución para ligandos del MHC-I es típicamente gaussiana, un efecto diferencial entre dos subconjuntos se revelaría como un desplazamiento global de las gaussianas, mientras que la ausencia de efecto se evidenciaría como gaussianas superpuestas.

Además de este análisis global, se secuenciaron los péptidos más intensos en cada RI en todas las comparaciones para determinar las características de los ligandos más representativos de cada subconjunto. En total se secuenciaron 372 ligandos (*Apéndice I Tabla S4*) cuya distribución de masa y longitud se resume en la **Tabla VIII**.

Peso molecular del péptido (Da)	Longitud del péptido (número de residuos)							
	<9		9		10		>10	
Rango	N	%	N	%	N	%	N	%
850-900	3	100.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
900-1000	8	21.1	30	79.0	0	0.0	0	0.0
1000-1110	7	5.9	102	86.4	8	6.8	1	0.9
1100-1200	0	0.0	127	85.8	20	13.5	1	0.7
1200-1300	0	0.0	24	52.2	19	41.3	3	6.5
1300-1400	0	0.0	1	8.3	7	58.3	4	33.3
1400-1500	0	0.0	0	0.0	0	0.0	4	100.0
1500-1600	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	100.0
1600-1700	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	100.0
Total	18	4.8	284	76.3	54	14.5	16	4.3

Tabla VIII. Distribución de los ligandos de HLA-B*27:04 secuenciados en función de su longitud para un rango de masa dado. Los porcentajes totales presentados en la última fila de la tabla son relativos a las 372 secuencias.

R.1.2.1. Comparación de los peptidomas de HLA-B*27:04 expresados en contextos de ERAP1 dispares

Se analizó si variantes de ERAP1 con polimorfismos distintos (**Tabla VII**), que afectan a la actividad de la enzima, tenían consecuencias en los peptidomas presentados por HLA-B*27:04 (**Tabla IX**):

1) We-I/JSL (**Figura 9A**): estas dos líneas se diferenciaban en 6 polimorfismos asociados diferencialmente a EA en ERAP1. Se detectaron un total de 3222 ligandos compartidos, en el único experimento que fue posible realizar, con una masa media de 1162 Da. Para RI>3 se observaron las mayores diferencias en masa de todas las comparaciones: 73.1 Da. En el RI intermedio, las diferencias disminuyeron pero todavía seguían mostrando valores altos: 49.2 Da. Por último en RI>1.1.5, que comprende los péptidos de expresión similar, las diferencias llegaron a alcanzar valores similares al error experimental; 9.5 Da.

2) We-I/C1R04 (**Figura 9B**): se realizaron dos experimentos independientes. Las variantes de ERAP1 en estas dos líneas difieren en 4 polimorfismos. La masa media para el total de ligandos compartidos fue de 1155.8 Da. Las diferencias en peso molecular en el subconjunto RI>3 fueron más bajas que en la comparación anterior, con un valor promedio de 53.5 Da. Estas diferencias se redujeron ligeramente para la RI intermedia y decrecieron hasta valores del error experimental en la RI de expresión similar.

En ambas comparaciones a la presencia de mayor número de polimorfismos de ERAP1 protectores para la EA se correlacionó con un incremento en la expresión de ligandos de mayor peso molecular.

R.1.2.2. Comparación de los peptidomas de HLA-B*27:04 expresados en contextos de ERAP1 similares

Para poder establecer el fondo de variabilidad natural en el peptidoma ajeno a ERAP1, se realizó un control con variantes de ERAP1 muy similares mediante la comparación C1R04/KNE (**Tabla VII**). Se realizaron tres experimentos independientes. La masa media de los ligandos compartidos fue de 1153.1 Da. La diferencia promedio entre los subconjuntos de RI>3 fue de 23.2 Da y estas diferencias disminuyeron en los otros dos subconjuntos entre las dos líneas celulares (**Figura 9C, Tabla IX**).

Para establecer el error experimental técnico se comparó C1R04 consigo misma. Se obtuvieron un total de 8403 péptidos compartidos presentando una diferencia máxima de peso molecular en el subconjunto de péptidos RI>3 de 9.1 Da, fijando así el error experimental (**Tabla IX**).

Exp	Comp	Péptidos totales			RI>1.0 ^b		RI >3.0		RI >1.5-3.0		RI >1.0-1.5 ^b	
		N (%)	m/z	Intensidad	N (%)	m/z	N (%)	m/z	N (%)	m/z	N (%)	m/z
1	<u>We-I</u>	3222 (100)	1162.0	2028	1726 (54)	1177.8	289 (9)	1197.4	686 (21)	1179.2	751 (23)	1168.9
	<u>JSL</u>	3222 (100)	1162.0	1865	1493 (46)	1144	260 (8)	1124.3	554 (17)	1130	679 (21)	1163
	<u>m/z</u>					33.8		73.1		49.2		5.9
2	<u>We-I</u>	5240 (100)	1154.3	1181	2439 (47)	1170.6	380 (7)	1170.6	888 (17)	1176.7	1171 (22)	1165.8
	<u>C1R04</u>	5240 (100)	1154.3	1246	2790 (53)	1139.9	439 (8)	1112	1089 (21)	1138.3	1262 (24)	1151.1
	<u>m/z</u>					30.7		58.6		38.4		14.7
3	We-I	3558 (100)	1157.2	435	1277 (36)	1173.7	194 (5)	1192.2	426 (12)	1187	657 (18)	1159.7
	C1R04	3558 (100)	1157.2	593	2266 (64)	1147.6	541 (15)	1143.8	875 (25)	1143.9	850 (24)	1153.7
	<u>m/z</u>		1155.8			26.2		48.4		43.1		6
	Media $\Delta m/z$					28.5 ± 3.2		53.5 ± 7.2		40.8 ± 3.3		10.4 ± 6.2
4	<u>C1R04</u>	6974 (100)	1149.4	2799	4553 (65)	1151.5	1009 (14)	1141.9	1832 (26)	1156.3	1712 (25)	1151.9
	<u>KNE</u>	6974 (100)	1149.4	2083	2412 (35)	1145.3	323 (5)	1133.3	804 (12)	1146.9	1285 (18)	1147.4
	<u>m/z</u>					6.2		8.6		9.4		4.5
5	C1R04 (I)	6351 (100)	1154.4	3451	3604 (57)	1159.5	880 (14)	1160.2	1389 (22)	1158.4	1335 (21)	1160.3
	KNE	6351 (100)	1154.4	3288	2923 (46)	1148.1	533 (8)	1126.7	1079 (17)	1141.5	1311 (21)	1162.2
	<u>m/z</u>					11.4		33.5		16.9		-1.9
6	C1R04 (II)	6395 (100)	1155.6	3361	3511 (55)	1161.7	753 (12)	1157.4	1451 (23)	1160.7	1307 (20)	1165.2
	KNE	6395 (100)	1155.6	3329	2878 (45)	1148.2	551 (9)	1129.8	1134 (18)	1146.5	1193 (19)	1158.2
	<u>m/z</u>		1153.1			13.5		27.6		14.2		7
	Media $\Delta m/z$					10.4±3.8		23.2±13.1		13.5±3.7		3.2±4.6
7	C1R04 (I)	8403 (100)	1169.0	2918	4439 (53)	1169.4	479 (6)	1153.5	1650 (20)	1162.6	2310 (27)	1177.7
	C1R04 (II)	8403 (100)	1169.0	2771	3959 (47)	1168.4	274 (3)	1144.4	1574 (19)	1163.8	2111 (25)	1174.9
	<u>m/z</u>					1		9.1		-1.2		2.8

Tabla IX. Expresión relativa y masa media de los ligandos compartidos presentados por líneas HLA-B*27:04 en diferentes contextos de ERAP1. Exp: experimento, N: número y porcentaje (%) de péptidos, m/z: valor medio de la relación masa/carga en un subconjunto de péptidos en MALDI TOF /MS. Intensidad: media de la intensidad de todos los ligandos compartidos. ^bMasas con RI =1 no se tuvieron en cuenta. Las comparaciones en cursiva y subrayadas fueron las que se escogieron como representativas para las figuras en cada comparación.

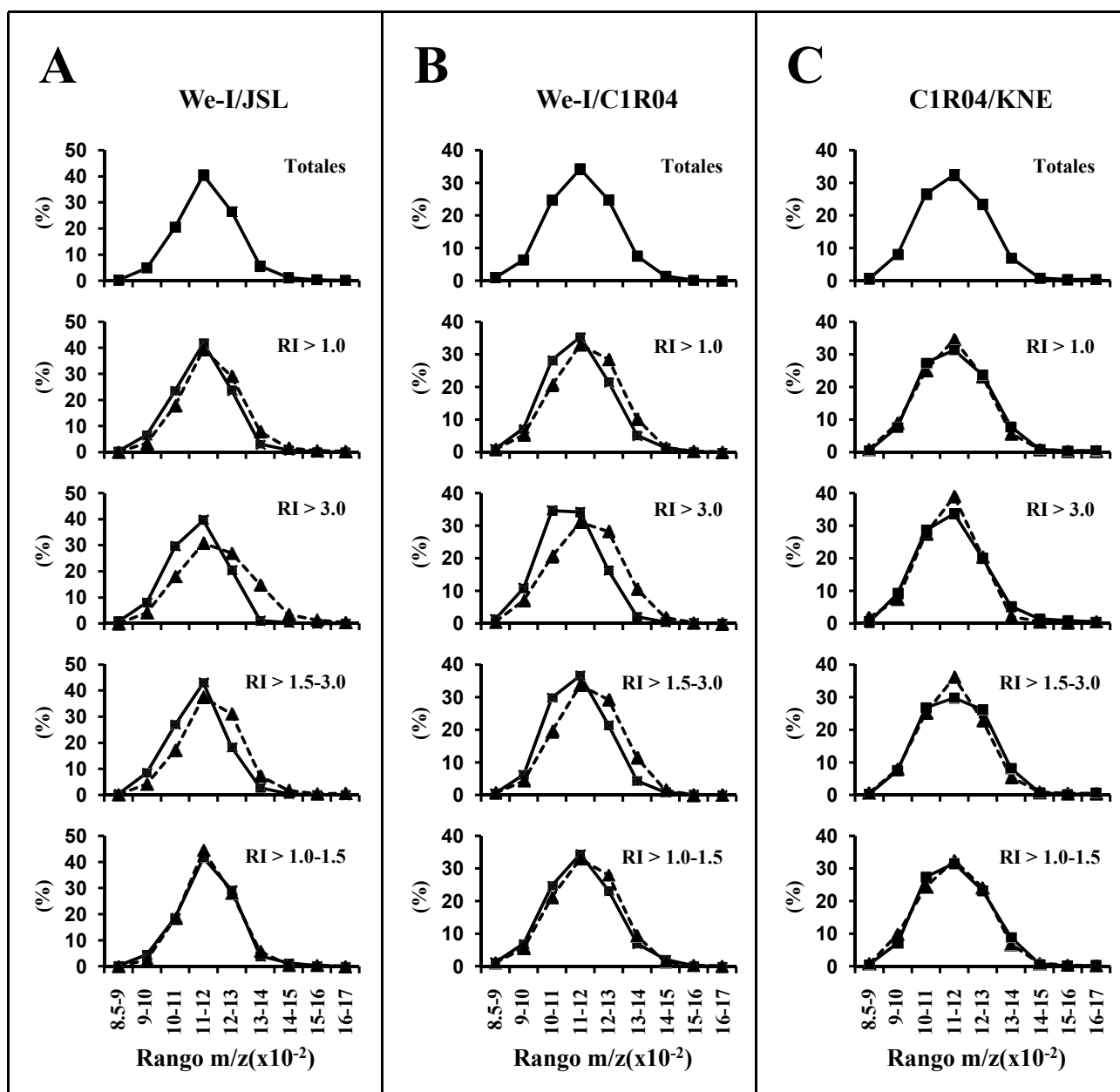


Figura 9: Distribución de tamaños de los ligandos de HLA-B*27:04 en función de su abundancia relativa en varios contextos de ERAP1. La figura muestra experimentos representativos. (A) We-I/JSL. El gráfico superior izquierdo muestra la distribución de peso molecular de 3222 péptidos compartidos entre ambas líneas. Los otros cuatro histogramas comparan las distribuciones de peso molecular correspondientes a los subconjuntos de péptidos en función de las diferentes RI para We-I (línea discontinua) y JSL (línea continua). (B) We-I/C1R04. En el histograma superior central se muestra la distribución de peso molecular de los 5240 péptidos compartidos. En los otros cuatro se compara la distribución de peso molecular de los péptidos en función de las diferentes RI para We-I (línea discontinua) y C1R04 (línea continua). (C) C1R04/KNE. En el histograma superior derecho se muestra la distribución de peso molecular de los 6974 péptidos compartidos. En los otros cuatro se compara la distribución de peso molecular de los péptidos en función de las diferentes RI para C1R04 (línea continua) y KNE (línea discontinua).

R.1.2.3. Efecto del polimorfismo de ERAP1 sobre la longitud de los ligandos de HLA-B*27:04

Debido a las diferencias en peso molecular encontradas en el subconjunto de péptidos RI>3, se analizaron las características de los péptidos secuenciados para hallar la causa de tales diferencias. Se utilizó como referencia la **Tabla VIII**, que indica los porcentajes de péptidos de distintas longitudes en cada rango de peso molecular, para convertir la distribución de pesos moleculares de cada línea en cada subconjunto, en distribución de longitudes peptídicas. Lo que se observó fue que las diferencias más altas en masa se debían a una mayor frecuencia de péptidos más largos (**Figura 10**):

1) We-I/JSL (**Figura 10A**): del total de ligandos compartidos se estimó que un 2.5% de sus péptidos correspondían a octámeros o péptidos más pequeños, 70,7% a nonámeros y un 26.9% a decámeros o péptidos más largos. Al analizar los péptidos en los subconjuntos predominantes (RI>1.5-3 y RI>3), se observó una tendencia clara hacia péptidos más largos para We-I, llegando a ser hasta 5 veces más abundantes las especies de más de 10 residuos, y más abundantes los péptidos cortos para JSL.

2) We-I/C1R04 (**Figura 10B**): del total de ligandos compartidos se estimó que un 3.7% correspondían a octámeros o péptidos más cortos, 69.2% a nonámeros y 27.1% a decámeros o péptidos más largos. Al analizar los péptidos en los subconjuntos predominantes, se observó una tendencia hacia péptidos más largos para We-I y más cortos para C1R04 pero sin ser tan marcada como en la comparación anterior.

3) C1R04/KNE (**Figura 10C**): del total de ligandos compartidos se estimó que un 3.9% correspondían a octámeros o péptidos más cortos, 70.1% a nonámeros y 26.0% a decámeros o péptidos más largos. Al analizar la distribución de longitudes para cualquier subconjunto se observó que no había diferencias apreciables salvo de forma ligera, en RI>3 para los péptidos mayores de 10 residuos, aunque estos son una fracción muy baja del total.

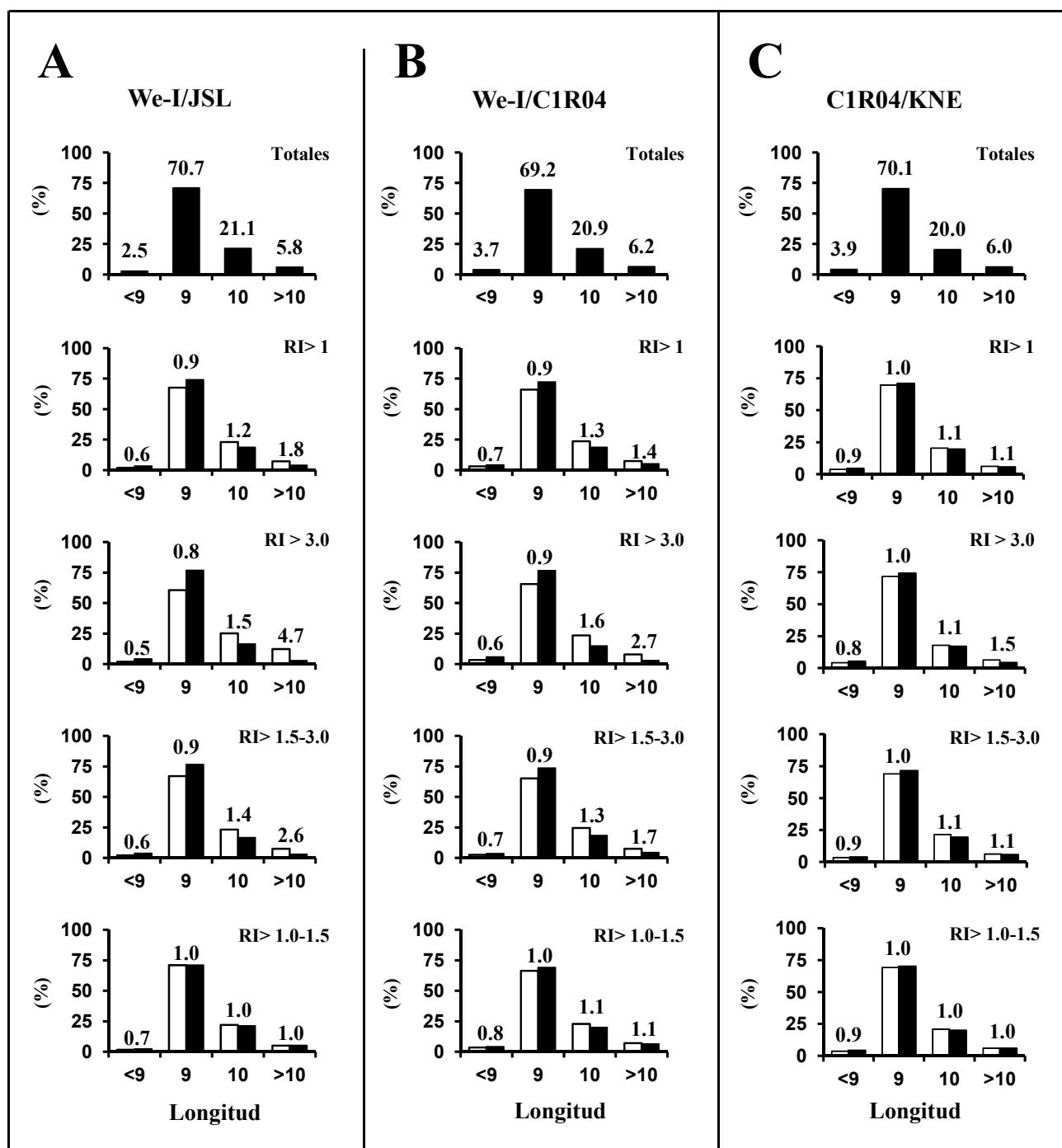


Figura 10. Distribución por longitudes (N° de residuos) de los ligandos de HLA-B*27:04 en función de su abundancia relativa en varios contextos de ERAP1. (A) We-I/JSL. El histograma superior muestra la distribución de longitudes de 3222 péptidos compartidos entre ambas líneas. Se indica el porcentaje de péptidos de <9, 9, 10 y >10 residuos. Los otros cuatro histogramas comparan las distribuciones correspondientes a los subconjuntos de péptidos predominantes en We-I (barras blancas) y JSL (barras negras). El cociente entre el porcentaje de péptidos de la misma longitud en las dos líneas celulares se indica sobre las correspondientes barras. (B) We-I/C1R04. El histograma superior muestra la distribución de longitudes de 5240 péptidos compartidos entre ambas líneas. Los otros cuatro histogramas comparan las distribuciones correspondientes a los subconjuntos de péptidos predominantes en We-I (barras blancas) y C1R04 (barras negras) siguiendo los mismos criterios que en A. (C) C1R04/KNE. El histograma superior muestra la distribución de longitudes de 6974 péptidos compartidos entre ambas líneas. Los otros cuatro histogramas comparan las distribuciones correspondientes a los subconjuntos de péptidos predominantes en C1R04 (barras negras) y KNE (barras blancas) siguiendo los mismos criterios que en A.

R.1.2.4. Efecto del polimorfismo de ERAP1 independiente de la longitud sobre los ligandos de HLA-B*27:04

Con los ligandos secuenciados para cada comparación de los subconjuntos de RI>3, se analizó por un lado, la distribución de longitudes y por otro el peso molecular de los residuos en las posiciones internas y C-terminal de los nonámeros (**Figura 11**). De modo similar al análisis global de tamaños realizado en el apartado anterior, JSL presentó mayor frecuencia de nonámeros y péptidos más pequeños que We-I, pero ésta última mostró una distribución de longitudes más parecida a C1R04 (**Figura 11A**). En todos los casos la población más abundante fue la de nonámeros.

Cuando se comparó el peso molecular medio de los nonámeros entre We-I y JSL se observó una diferencia de tan solo 2.1 Da. Sin embargo, al analizar el peso molecular medio en las posiciones internas de los ligandos se observaron dos posiciones con diferencias notables (**Figura 11B**); P1 y P4. El mayor peso molecular de JSL respecto a We-I en P1 (25.8 Da) se debió fundamentalmente a un elevado porcentaje de Arg en JSL. En P4, JSL presentó una alta frecuencia de residuos poco voluminosos (Ala, Gly y Ser) mientras que We-I presentó residuos con un volumen elevado (Lys, Arg, Phe y Tyr) (**Figura 11C**). Al comparar el peso molecular medio de los nonámeros entre We-I y C1R04 las diferencias fueron de 7.3 Da. El estudio pormenorizado de las diferencias de peso molecular por posición mostró diferencias destacables en el uso diferencial de residuos en P4 (**Figura 11B**). En esta comparación la diferencia en el uso de cadenas laterales en función del volumen se debió fundamentalmente a la mayor frecuencia de Gly y Pro en C1R04 y de Val, Lys y Arg en We-I (**Figura 11C**).

Estos resultados indican que el polimorfismo de ERAP1 influye, no sólo en la longitud, sino también en la estructura de los ligandos de HLA-B*27:04, con independencia de la longitud. Esta influencia se manifiesta en el peso molecular diferencial de los residuos P1 (We-I/JSL) y del residuo P4 en sendas comparaciones, siendo este último seleccionado principalmente en base al volumen de la cadena lateral.

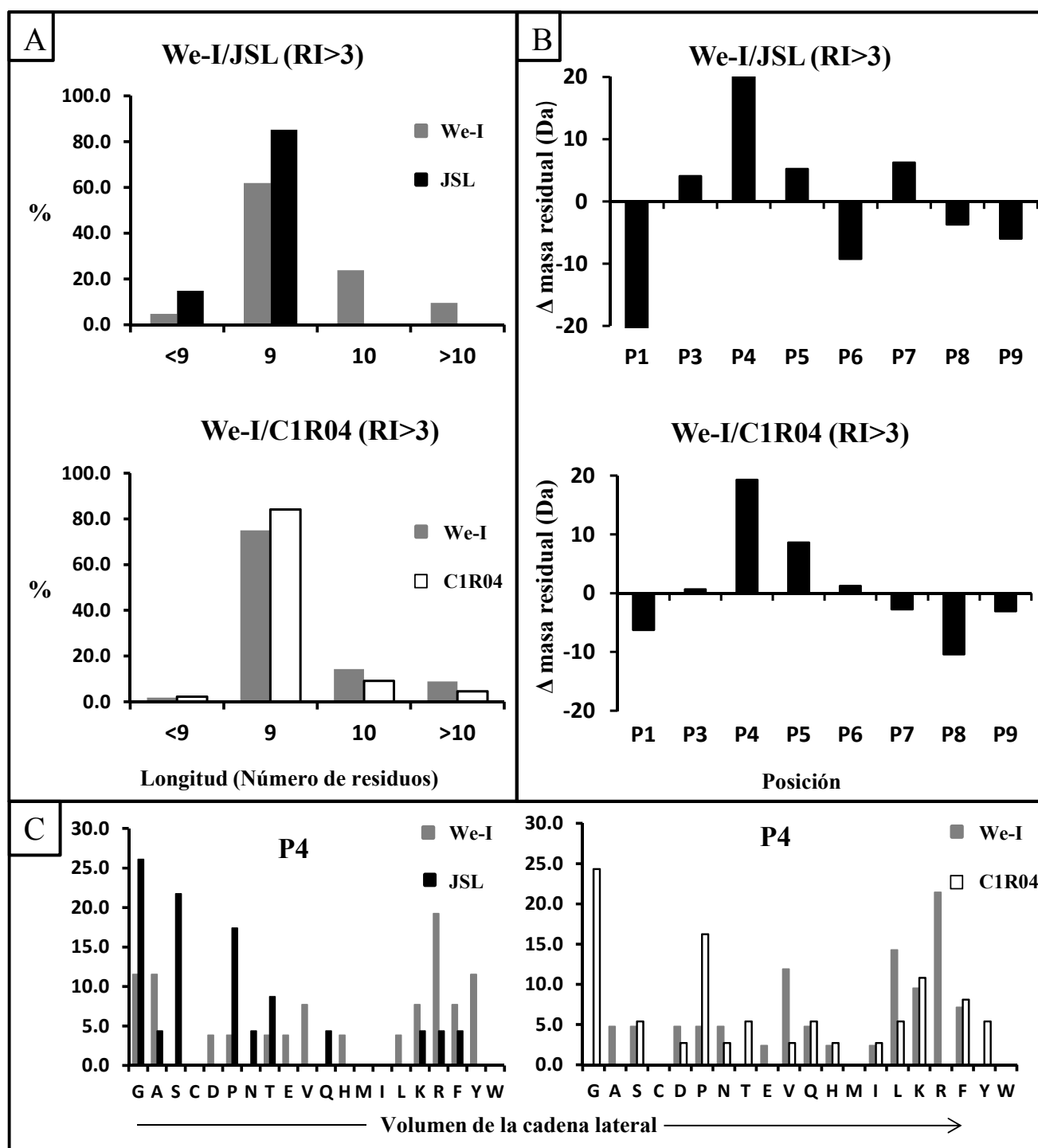


Figura 11. Características diferenciales de los ligandos de HLA-B*27:04 en los subconjunto de RI>3 en las comparaciones indicadas. A: distribución de longitudes entre los ligandos predominantes secuenciados para las comparaciones We-I (42 ligandos)/JSL (27 ligandos) (arriba) y We-I (56 ligandos)/C1R04 (44 ligandos) (abajo). B: diferencia de la masa residual media en cada posición de los nonúmeros en la comparación We-I (26 ligandos)/JSL (23 ligandos) (arriba) We-I (42 ligandos)/C1R04 (37 ligandos) (abajo). P2 no se tuvo en cuenta porque todos los ligandos presentan Arg en dicha posición. C: frecuencia de residuos en función del volumen de la cadena lateral en la posición P4 en la comparación We-I/JSL (Izquierda) y We-I/C1R04 (derecha). Los aminoácidos están ordenados de menor a mayor volumen (de izquierda y derecha).

R.1.3. Mecanismo molecular de la expresión diferencial de ligandos de HLA-B*27:04 asociada al polimorfismo de ERAP1

Una vez establecidas las diferencias que los polimorfismos de ERAP1 generaban en la configuración del repertorio peptídico, se analizaron cuáles eran los factores moleculares responsables. ERAP1 tiene una actividad aminopeptidasa, pero con diferente grado de capacidad hidrolítica sobre los 20 aminoácidos (Hearn *et al.*, 2009). Usando los valores asociados a la susceptibilidad relativa a ERAP1 para cada aminoácido (**Tabla VI**), se comparó la susceptibilidad global de los residuos flanqueantes (P-2 y P-1) y de P1 en los subconjuntos peptídicos de igual rango de RI entre líneas celulares. Los valores medios de susceptibilidad para cada posición fueron analizados en las comparaciones We-I/JSL, We-I/C1R04 y C1R04/KNE para cada subconjunto de RI. La mayor o menor susceptibilidad media de los residuos en una posición entre los mismos subconjuntos peptídicos de las líneas comparadas se estimó como el cociente entre ambos valores (**Tabla X**). A su vez, puesto que las características internas y del residuo C-terminal del epítipo afectan a la capacidad hidrolítica de ERAP1 (Evnouchidou *et al.*, 2008), se asignaron los valores descritos de influencia relativa para los aminoácidos estudiados en cada una de estas posiciones, para estimar su contribución a la hidrólisis por ERAP1 en los subconjuntos peptídicos comparados. Para estos análisis los péptidos secuenciados se clasificaron en dos subconjuntos de RI, RI>3 y RI>1-3.

La influencia de ERAP1 sobre la expresión de un determinado ligando de HLA-B*27 viene determinada por el balance entre dos factores: 1) susceptibilidad a la hidrólisis de los residuos flanqueantes N-terminales (P-2 y P-1), la cual determina la generación del ligando, 2) susceptibilidad a la hidrólisis de P1, la cual determina la destrucción del ligando, debido a que HLA-B*27 une mayoritariamente ligandos con arginina en P2 y se pierde el motivo de anclaje.

R.1.3.1. Efecto de la susceptibilidad de los residuos flanqueantes y de P1 a la hidrólisis por ERAP1 sobre el peptidoma de HLA-B*27:04

1) We-I/JSL: Para el subconjunto de péptidos con RI>3 los péptidos de We-I presentaron una susceptibilidad media de sus residuos flanqueantes 1.4 veces mayor que JSL. Esta diferencia se acrecentó cuando comparamos la susceptibilidad en P1, siendo en We-I 2.5 veces mayor que en JSL. Este resultado indica que en el contexto de una variante de ERAP1 de menor actividad (We-I) predominan péptidos con residuos N-terminales más susceptibles. Presumiblemente, ello es debido a que éstos son destruidos más eficientemente por la variante más activa (JSL). Por tanto las diferencias de expresión de los ligandos de cada línea dependen de la facilidad o resistencia que encuentra cada variante de ERAP1 para generar el ligando, pero sobre todo de la capacidad de destrucción del mismo en función de la susceptibilidad del residuo P1. Cuando analizamos los valores de susceptibilidad para los péptidos de expresión similar (RI>1-3) se observó que sus diferencias eran prácticamente nulas (**Tabla X**).

2) We-I/C1R04: solo se apreciaron diferencias significativas en las posiciones flanqueantes en los subconjuntos de RI>3 siendo los péptidos de We-I 1.4 veces más susceptibles. Por tanto en esta comparación el factor que genera desigualdades en los niveles de expresión de los ligandos tiene que ver con la mayor o menor facilidad para generar el epítipo y no con la destrucción diferencial de los ligandos. Al comparar la RI de expresión similar no se encontraron diferencias significativas (**Tabla X**).

3) C1R04/KNE: En esta comparación, que implica contextos similares de ERAP1, no se observaron diferencias en el uso de residuos con distinto grado de susceptibilidad (**Tabla X**).

Comparación	Péptidos	Valores medios de susceptibilidad a ERAP1			
We-I/JSL		P-2	P-1	P-2+P-1	P1
RI>3	42/27	34.2/14.4	38.4/37.9	72.6/52.3	29.9/12.0
	Cociente	2.4	1.0	1.4	2.5
RI>1.0-3.0	46/42	34.8/23.3	44.5/48.5	79.2/71.8	17.1/20.4
	Cociente	1.5	0.9	1.1	0.8
We-I /C1R04					
RI>3	56/44	38.5/26.5	46.3/36.1	84.7/62.6	23.4/22.6
	Cociente	1.5	1.3	1.4	1.0
RI>1.0-3.0	52/43	30.3/33.8	41.7/43.6	72.0/77.5	20.6/19.5
	Cociente	0.9	1.0	0.9	1.1
KNE/C1R04					
RI>3	66/97	33.6/30.7	42.9/36.1	75.9/66.4	19.4/23.2
	Cociente	1.1	1.2	1.1	0.8
RI>1.0-3.0	37/42	27.3/25.9	46.3/36.8	73.6/62.8	20.7/21.7
	Cociente	1.1	1.3	1.2	1.0

Tabla X. Influencia de la secuencia N-terminal en la expresión de péptidos de HLA-B*27:04 en diferentes contextos de ERAP1. Se muestran los valores medios de susceptibilidad para las posiciones flanqueantes (P-2 y P-1) y P1 para cada comparación y en los dos subconjuntos de RI.

R.1.3.2. Efecto de la secuencia interna del ligando sobre la hidrólisis por ERAP1

El procedimiento de este análisis viene descrito en el apartado M.7 (**Tabla VI**). Se comparó el efecto de las posiciones internas y del residuo C-terminal (P3-P9) tomando los valores medios de influencia relativa en el corte por ERAP1, para los subconjuntos de ligandos con RI>3 y RI>1-3. Los resultados se muestran en la **Tabla XI**. Aunque se observaron diferencias en la contribución de posiciones individuales, el aporte neto de todas las posiciones sobre la acción hidrolítica de ERAP1 esencialmente tuvo una contribución nula en todas las comparaciones (**Tabla XI**).

Comparación	Posición del residuo estudiado								
We-I/ JSL	N	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	Promedio
Cociente RI>3.0	26/23	1.2	2.4	1.9	0.7	1.0	0.7	0.9	1.0
Cociente RI>1.0-3.0	34/34	1.2	1.0	1.0	0.7	1.5	0.8	1.1	1.0
We-I/C1R04	N	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	Promedio
Cociente RI>3.0	42/37	1.3	2.0	1.5	0.8	0.8	2.2	1.0	1.1
Cociente RI>1.0-3.0	35/32	1.1	1.0	1.4	1.1	0.7	0.9	0.9	1.0
KNE/C1R04	N	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	Promedio
Cociente RI>3.0	58/64	1.0	1.6	2.2	1.0	0.6	0.9	1.1	1.0
Cociente RI>1.0-3.0	32/33	1.0	2.3	1.2	0.7	0.3	1.8	1.0	1.0

Tabla XI. Influencia de la secuencia interna en la expresión de nonámeros de HLA-B*27:04 en el contexto de variantes diferenciales de ERAP1. En las columnas segunda a octava se muestran los valores medios de contribución a la hidrólisis de los residuos en cada posición. En la novena columna se muestra el promedio de la contribución de los residuos en las posiciones P3- P9. Se calculó la relación de la contribución media para cada posición y para el promedio de P3-P9. N: N° de nonámeros en cada subconjunto y línea celular.

R.1.4. Efecto del polimorfismo de ERAP1 sobre la termoestabilidad de HLA-B*27:04

Para analizar el efecto de las alteraciones en el peptidoma sobre la estabilidad de HLA-B*27:04, se realizaron ensayos de termoestabilidad sobre las cuatro líneas celulares estudiadas. JSL, KNE y C1R04 presentaron una termoestabilidad alta a partir de dos horas de caza, sin embargo We-I presentó una termoestabilidad menor (**Figura 12**). Este resultado sugiere que en el contexto de una variante de ERAP1 con baja actividad, no se genera un repertorio peptídico óptimo para HLA-B*27:04. Por tanto, las alteraciones inducidas en el peptidoma de HLA-B*27:04 por el polimorfismo de ERAP1 tiene efectos globales que pueden afectar a la estabilidad de la molécula de MHC-I.

R.1.5. Resumen

Las diferencias de actividad de ERAP1 se traducen en un predominio de péptidos más largos y con residuos N-terminales más susceptibles a la hidrólisis en el contexto de la variante menos activa y en alteraciones en algunas posiciones internas de la secuencia peptídica. Estos efectos atañen a un porcentaje significativo del peptidoma y llegan a afectar, en el caso de la variante menos activa, a la estabilidad global de HLA-B*27:04. Aun así, un porcentaje considerable de péptidos, que muestran una expresión similar en distintas líneas celulares, parece no verse afectado por el polimorfismo de ERAP1.

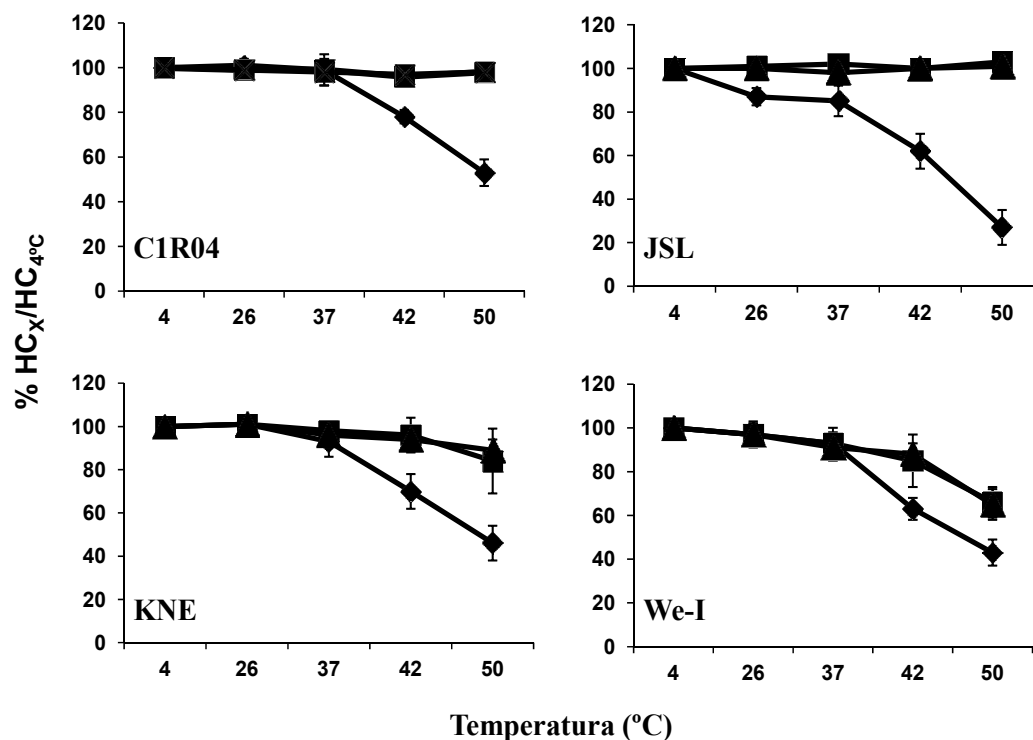


Figura 12. Termoestabilidad de LCL HLA-B*27:04 en varios contextos de ERAP1. Las células se marcaron durante 15 minutos y se realizaron cazas a 0, 2 y 4h. Se incubaron alícuotas iguales de lisados celulares durante 1h a las temperaturas indicadas antes de la inmunoprecipitación con el anticuerpo ME1, que reconoce complejos HLA-B*27/péptido en su conformación nativa pero no la HC desplegada. Posteriormente se separó el material por SDS-PAGE y se analizó por fluorografía. El porcentaje de complejos HLA-B*27/péptido recuperados en las cazas a 0h (♦), 2h (■) o 4h (▲) tras el calentamiento se representaron como la intensidad de HC a una temperatura dada (HC_x) relativa a la intensidad a 4°C ($HC_{4°C}$). Se presentan los valores medios con desviación estándar para 4 experimentos con C1R-B*27:04, 5 con KNE y 8 con We-I. Solamente se pudo llevar a cabo un experimento con JSL.

R.2. Efecto del polimorfismo de ERAP1 sobre el peptidoma de HLA-B*27:05

Una vez vistos los efectos causado por variantes de ERAP1 sobre el peptidoma de HLA-B*27:04, se quiso analizar si dicho efecto se observaría por igual en otros subtipos asociados a EA. Se eligió el subtipo HLA-B*27:05 por ser el más frecuente en la población caucasoide y el más estudiado. El procedimiento experimental fue el mismo que el seguido en el estudio sobre HLA-B*27:04 y se basó en el análisis comparativo de subconjuntos peptídicos clasificados en base a su RI, entre pares de líneas celulares que expresan diferentes variantes de ERAP1.

R.2.1. Caracterización de ERAP1 y ERAP2 en líneas celulares HLA-B*27:05⁺

Se analizaron en este estudio dos LCL HLA-B*27:05 y el transfectante C1R-B*27:05 (C1R05). Las variantes de ERAP1 en estas líneas se determinaron por secuenciación genómica de todos su exones. Las variantes de ERAP2 se caracterizaron por secuenciación de los SNP asociados a EA (Tabla XII).

SNP	Posición (Nucl./aa)	Consenso	LG2	C1R	P50
<i>rs26653</i>	380 / 127	g / R*	g / R*	c / P	c / P
<i>rs26618</i>	828 / 276	a / I	a / I	g / M	a / I
<i>rs27895</i>	1037 / 346	g / G	g / G	g / G	g / G
<i>rs2287987</i>	1045 / 349	a / M*	a / M*	a / M*	g / V
<i>rs30187</i>	1583 / 528	a / K*	a / K*	g / R	g / R
<i>rs10050860</i>	1723 / 575	g / D*	g / D*	g / D*	a / N
<i>rs17482078</i>	2174 / 725	g / R*	g / R*	g / R*	a / Q
<i>rs27044</i>	2188 / 730	c / Q*	g / E	g / E	g / E
SNP ERAP2					
<i>rs2549782</i>	1176 / 392	g / K*	g / K*	g / K*	g,t / K*,N
<i>rs2248374</i>	1575 / -	a / expresión	a	a	a,g

Tabla XII. Polimorfismos de ERAP1 y ERAP2 en líneas celulares HLA-B*27:05⁺. Solamente se muestran los cambios de base no sinónimos correspondientes a la hebra codificante del DNA. Los cambios de base asociados al riesgo de EA (Brown, 2008; Harvey *et al.*, 2009b) aparecen marcados con asteriscos, y los que implican variaciones con respecto a la secuencia consenso están señalados en negrita (Numero de Acceso para ERAP1 Q9NZ08-2 y para ERAP2 Q6P179-1).

LG2 presentó cinco polimorfismos asociados a un mayor riesgo a EA (posiciones: 127, 349, 528, 575, y 725), mientras que P50 tenía todos los polimorfismos protectores en dichas posiciones. C1R05 mostró un genotipo intermedio. Las tres líneas celulares muestran el mismo polimorfismo en la posición 730(E). El genotipado de ERAP2 para el SNP rs2549782 reveló que LG2 y C1R05 eran homocigotas para la posición 392(K) mientras que P50 es heterocigota. A su vez se genotipó el SNP rs2248374, que está en fuerte desequilibrio de ligamiento con rs2549782 y provoca la no expresión de ERAP2 (Andres *et al.*, 2010).

Cuando se controla el efecto de las mutaciones individuales, la asociación del polimorfismo de ERAP1 con EA se ajusta a un modelo de dos mutaciones en las que el efecto primario es debido a la posición 528 (K528R) y un efecto secundario es debido a las posiciones 575 y 725 (D575N/R725Q), que en el análisis genético muestran un desequilibrio de ligamiento casi absoluto (The TASK and WTCCC2 Consortia, 2011). El patrón de polimorfismo que presentan las tres líneas celulares utilizadas en este estudio nos permitió evaluar separadamente los efectos de ambas mutaciones sobre el peptidoma de HLA-B*27:05. Por ejemplo, la comparación LG2/C1R05 permitió evaluar el efecto de la mutación K528R (junto con el polimorfismo frecuentemente ligado R127P). La comparación C1R05/P50 permitió evaluar el efecto de las mutaciones D575N/R725Q en ausencia de cambios en las posiciones 127 y 528. Finalmente, la comparación LG2/P50 permitió evaluar el efecto combinado del polimorfismo en 127/528 y 575/725.

Los niveles de expresión de proteína de ERAP1 y ERAP2 se analizaron por Western blot (**Figura 13**). Las tres líneas celulares expresan niveles similares de ERAP2 pero distintos niveles de ERAP1. LG2 fue la variante con mayor grado de expresión de ERAP1: 1.5 veces más que P50 y 3 veces más que C1R05.

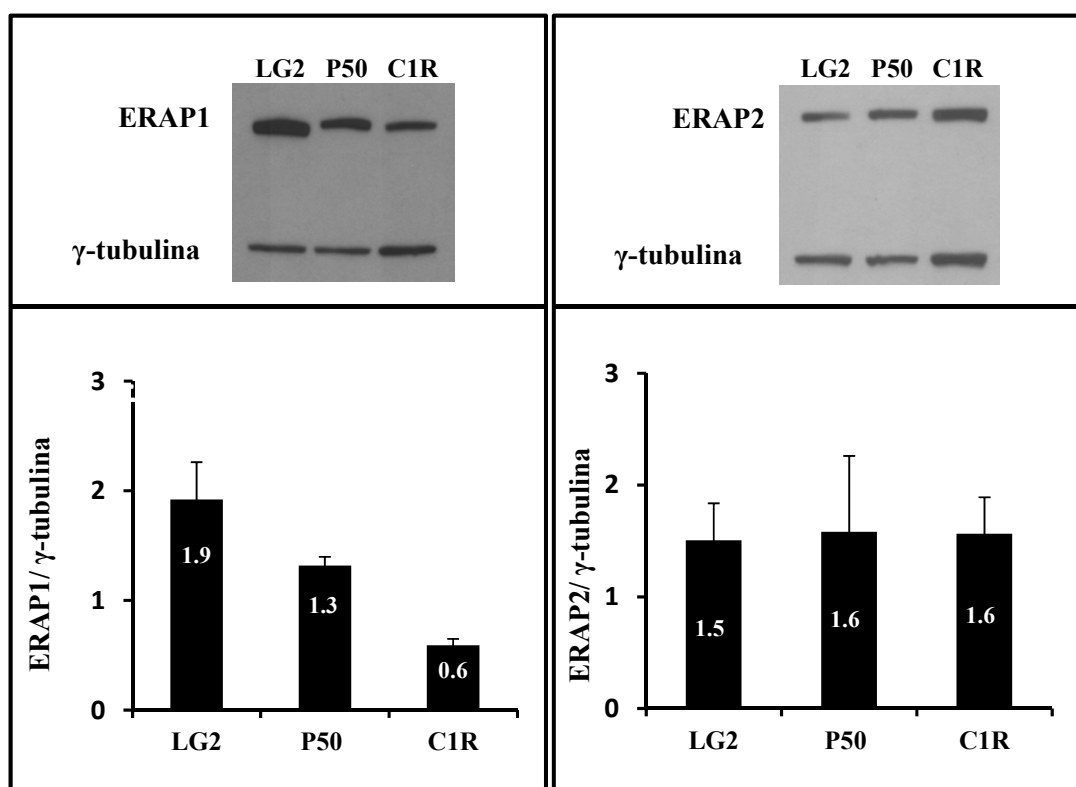


Figura 13. Expresión de ERAP1 y ERAP2 relativizada al nivel de γ -tubulina para las líneas celulares indicadas. En la parte superior, de izquierda a derecha, se muestran las radiografías que ejemplifican los niveles de expresión de ERAP1 y ERAP2. El panel inferior izquierdo muestra el nivel de proteína de ERAP1 revelado con peroxidasa tras el reconocimiento del mAb 6H9 anti-ERAP1. El panel inferior derecho muestra el nivel de proteína de ERAP2 revelado con peroxidasa tras reconocer el anticuerpo 3F5 anti-ERAP2. Los resultados son la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes.

R.2.2. Análisis comparativo de la expresión de ligandos de HLA-B*27:05 en diferentes contextos de ERAP1

La estrategia experimental seguida fue como la que se describe en el apartado **R.1.2**. Las fracciones colectadas por HPLC se sometieron a espectrometría de masas de MALDI-TOF. Los espectros correspondientes a cada par de líneas celulares se alinearon con una tolerancia de ± 1 fracción de elución y ± 0.2 Da de masa en cada comparación. Tras superar los filtros descritos en el apartado **R.1.2** aplicados por el MSHandler se obtuvieron los listados de péptidos compartidos. Estos se desglosaron en tres subconjuntos en función de sus RI. Las comparaciones se realizaron por triplicado (por duplicado para LG2 vs P50). Se realizó un control para evaluar el error intrínseco de la técnica comparando C1R05 consigo misma. Es destacable que en el control de C1R05/C1R05, al establecer la RI en $RI > 2.5$ en vez de $RI > 3$, la diferencia de masa pasó de 22.8 Da a 9.5 Da, por lo que la primera diferencia probablemente sobreestimaba el error intrínseco (**Tabla XIII**).

R.2.2.1. Efecto dominante del polimorfismo K528R sobre el peptidoma de HLA-B*27:05

Como se ha mencionado, de las tres comparaciones realizadas, LG2/P50 y LG2/C1R05 presentaban la diferencia en la posición 528 de ERAP1, mientras que C1R05/P50 implicaba la diferencia en las posiciones 575/725 pero no en la 528. La distribución de pesos moleculares en las tres comparaciones mostró una correlación clara con el polimorfismo K528R (**Figura 14**). Así, en las dos comparaciones con LG2, los péptidos con $RI > 3$ mostraron un desplazamiento hacia pesos moleculares más altos respecto, a P50 y C1R05. Estas diferencias fueron disminuyendo progresivamente desde el subconjunto de $RI > 1.5-3.0$ hasta $RI > 1.0-1.5$ donde alcanzaron valores a nivel del error experimental. En la comparación C1R05/P50 no se observaron diferencias en la distribución de pesos moleculares de los péptidos en ninguno de los subconjuntos de RI. Estos resultados indican un efecto dominante del polimorfismo en la posición 528, al menos en el contexto del cambio asociado en la posición 127, sobre el peso molecular de los ligandos de HLA-B*27:05, de forma que con la variante más activa (LG2: K528) predominan péptidos con pesos moleculares más altos.

Exp	Comparación	Totales			RI>3.0		RI>1.5-3.0		RI>1.0-1.5	
		N (%)	m/z	Intensidad	N (%)	m/z	N (%)	m/z	N (%)	m/z
1	LG2	6102 (100)	1171.8	2465	1089 (17.8)	1166.5	1887 (30.9)	1174.2	1354 (22.6)	1170.2
	P50	6102 (100)	1171.8	1564	140 (2.3)	1113.2	590 (9.7)	1167.7	984 (16.1)	1170.6
	m/z					53.2		6.5		-0.4
2	<u>LG2</u>	7075 (100)	1179.9	5161	900 (12.7)	1184.3	1293 (18.3)	1206	1086 (15.3)	1195.9
	<u>P50</u>	7075 (100)	1179.9	5934	1358 (19.2)	1133.6	1404 (19.8)	1176.4	1032 (14.6)	1191.7
	m/z					50.7		29.6		4.2
1-2	Media Δm/z					52.0		18.1		1.9
3	<u>LG2</u>	6953 (100)	1169.2	2496	455 (6.5)	1199.7	1031 (14.8)	1181.6	1180 (17.0)	1181.8
	<u>C1R05</u>	6953 (100)	1169.2	3073	946 (13.6)	1141.6	1888 (27.2)	1162	1451 (20.9)	1168
	m/z					58.1		19.6		13.8
4	LG2	6503 (100)	1178.5	5329	1170 (18.0)	1196.6	1599 (24.6)	1190.9	1075 (16.5)	1178.9
	C1R05	6503 (100)	1178.5	4085	705 (10.8)	1138.3	1009 (15.5)	1170.4	944 (14.5)	1173.6
	m/z					58.3		20.5		5.3
5	LG2	6796 (100)	1179.4	5198	929 (13.7)	1198.4	1364 (20.1)	1193.2	1259 (18.5)	1187.6
	C1R05	6796 (100)	1179.4	4333	800 (11.8)	1137.9	1207 (17.8)	1166.6	1235 (18.2)	1181.4
	m/z					60.5		26.6		6.2
3-5	Media Δm/z					59.0±1.3		22.2±3.8		8.4±4.7
6	C1R05	6104 (100)	1160.3	3104	1904 (31.2)	1150.4	1859 (30.5)	1158.1	955 (15.6)	1171.8
	P50	6104 (100)	1160.3	1595	241 (3.9)	1152.8	502 (8.2)	1170.7	642 (10.5)	1173.1
	m/z					-2.4		-12.6		-1.3
7	<u>C1R05</u>	6204 (100)	1170.3	4154	1381 (22.3)	1149.4	894 (14.4)	1167	836 (13.5)	1185.8
	<u>P50</u>	6204 (100)	1170.3	5979	559 (9.0)	1147.1	1539 (24.8)	1181.1	995 (16.0)	1188.1
	m/z					2.3		-14.1		-2.3
8	C1R05	6773 (100)	1168.8	6088	1251 (18.5)	1143.6	1710 (25.2)	1170.9	1305 (19.3)	1181.9
	P50	6773 (100)	1168.8	4348	511 (7.5)	1145	973 (14.4)	1179.4	1020 (15.1)	1181.1
	m/z					-1.4		-8.5		0.8
6-8	Media Δm/z					-0.5±2.5		-11.7±2.9		-0.9±1.6
9	C1R05 (I)	7364 (100)	1182.5	3911	347 (4.7)	1168.6	1343 (18.2)	1173.1	1776 (24.1)	1185.2
	C1R05 (II)	7364 (100)	1182.5	4131	602 (8.2)	1145.8	1706 (23.2)	1192.0	1587 (21.6)	1194.2
	m/z					22.8		-18.9		-9.0

Tabla XIII. Comparación de los peptidomas de HLA-B*27:05 en las líneas celulares utilizadas para un rango de masa de 850-1700 Da. Las señales compartidas se clasificaron en diferentes grupos en base a la relación de intensidades entre las dos líneas celulares comparadas. Solo fueron analizadas las señales que superaron una intensidad de 300, salvo en el experimento N°1 que se fijó en 200. Para cada grupo se muestra el número (N) de péptidos, el porcentaje (%) que representan, m/z valor medio de la relación masa/carga en un subconjunto de péptidos en MALDI TOF /MS Las comparaciones subrayadas fueron las escogidas para la **Figura 14**.

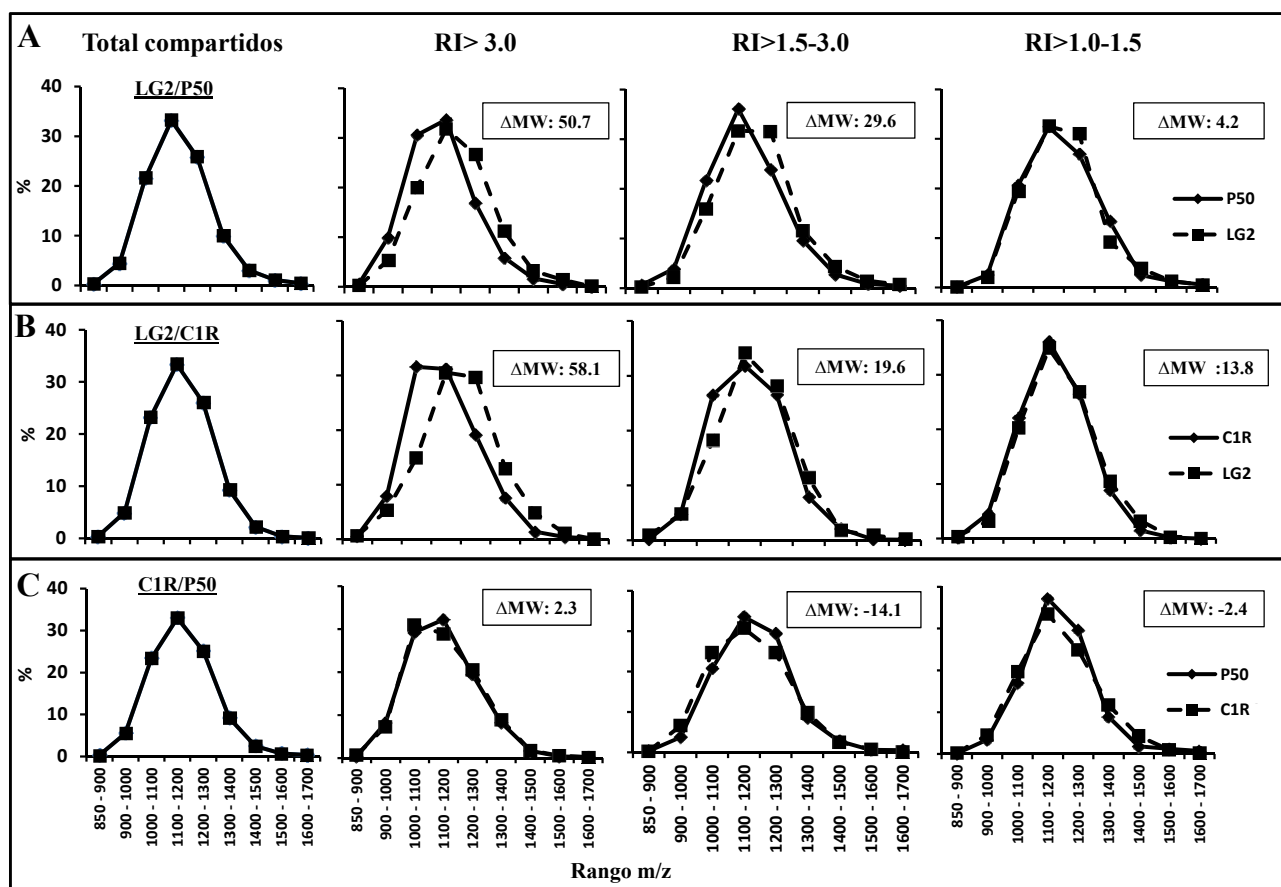


Figura 14. Distribución de los ligandos de HLA-B*27:05 por tamaño en función de su abundancia relativa en varios contextos de ERAP1. (A) LG2/P50. El gráfico superior izquierdo muestra la distribución de peso molecular de 7075 péptidos compartidos entre ambas líneas. Los otros tres histogramas a su derecha comparan las distribuciones de peso molecular (MW) correspondientes a los subconjuntos de péptidos en función de las diferentes RI para LG2 (línea discontinua) y P50 (línea continua). (B) LG2/C1R05. En el histograma central de la izquierda se muestra la distribución de peso molecular de los péptidos de los 6953 péptidos compartidos. En los otros tres se compara la distribución de peso molecular de los péptidos en función de las diferentes RI para LG2 (línea discontinua) y C1R05 (línea continua). (C) C1R05/P50. En el histograma inferior izquierdo se muestra la distribución de peso molecular de los péptidos de los 6204 péptidos compartidos. En los otros 3 se compara la distribución de peso molecular de los péptidos en función de las diferentes RI para C1R05 (línea discontinua) y P50 (línea continua).

R.2.2.2. El efecto del polimorfismo de ERAP1 sobre el peso molecular implica diferencias en la secuencia pero no en la longitud de los ligandos de HLA-B*27:05

Las diferencias de peso molecular observadas en los experimentos anteriores podrían ser debidas a la presencia de residuos más masivos y/o a longitudes mayores de los ligandos. Para conocer la base de este efecto, se determinó la secuencia de aminoácidos de un número significativo de péptidos asignados a los diferentes subconjuntos de RI en todas las comparaciones. También se determinó el peso molecular y la longitud media de dichos péptidos en cada subconjunto. Para este análisis los péptidos se clasificaron en dos subconjuntos de RI>3 y RI>1-3 (**Tabla XIV**).

En la comparación LG2/P50 los péptidos predominantes (RI>3) secuenciados en LG2 mostraron una diferencia de peso molecular de 74.9 Da y de 0.2 residuos de longitud. Para la comparación LG2/C1R05, los péptidos

predominantes secuenciados en LG2 mostraron una diferencia de peso molecular de 76.8 Da y 0.3 residuos de longitud. Estas diferencias en peso molecular fueron compatibles aunque más altas que las observadas en el global de señales para la RI>3 (**Figura 14**), lo que sugiere que los péptidos secuenciados son representativos del total de las señales analizadas. En P50/C1R05, se observaron solo diferencias exiguas en peso molecular y longitud (**Tabla XIV**), en consonancia con el análisis global de distribución de pesos moleculares (**Figura 14**).

Estos resultados indican que el polimorfismo de ERAP1 en las posiciones 127/528 no afecta sustancialmente a la longitud de los ligandos, pero sí a su peso molecular, lo que implica un efecto sobre el tamaño de los residuos peptídicos y por tanto sobre la secuencia.

Comparación	N° de péptidos	Longitud media	Δlongitud	Mw medio	ΔMw
LG2/P50					
RI>3	49/70	9.5/9.3	0.2	1169.4/1094.5	74.9 Da
RI>1-3	62/57	9.7/9.5	0.2	1173.3/1169.3	4.0 Da
LG2/C1R05					
RI>3	52/101	9.6/9.3	0.3	1195.7/1118.9	76.8 Da
RI>1-3	52/50	9.3/9.46	0.1	1123.4/1112.4	11.0 Da
P50/C1R05					
RI>3	74/63	9.6//9.5	0.1	1134.4/1127.1	7.3 Da
RI>1-3	76/61	9.4/9.3	0.1	1151.7/1130.6	21.1 Da

Tabla XIV. Peso molecular (Mw) y longitud de los péptidos secuenciados en cada comparación entre líneas celulares. Los péptidos secuenciados se clasificaron en dos subconjuntos de RI; RI>3 y RI>1-3. La tabla muestra el número de péptidos secuenciados en cada línea, su longitud y el peso molecular medio.

R.2.3. Mecanismo molecular de la expresión diferencial de ligandos asociada al polimorfismo de ERAP1

Si las alteraciones observadas en los peptidomas de HLA-B*27:05 son debidas a diferencias en la actividad enzimática de las distintas variantes de ERAP1 en cada línea celular, esperaríamos, teniendo en cuenta los resultados en HLA-B*27:04, una susceptibilidad diferencial de los residuos N-terminales a ERAP1 entre los péptidos de expresión dispar en las líneas celulares comparadas.

R.2.3.1. El polimorfismo de ERAP1 configura el peptidoma de HLA-B*27:05 en base a la susceptibilidad del residuo P1

El procedimiento de análisis fue idéntico al descrito en el punto **R.1.3**. Para cada comparación se analizaron los péptidos secuenciados de los subconjuntos RI>3 y RI>1-3. El número de péptidos en cada subconjunto osciló entre

50 y 100, hasta un total de 470 ligandos secuenciados de HLA-B*27:05 (*Apéndice II, Tabla S1*). Los valores medios de susceptibilidad a ERAP1 en cada subconjunto para las posiciones P-2, P-1 y P1 se muestran en la **Tabla XV**. Las susceptibilidades para las posiciones flanqueantes en cualquier subconjunto de RI fueron muy similares. Las únicas diferencias se apreciaron para el subconjunto de RI>3, en posición P1 y sólo, en las comparaciones LG2/P50 y LG2/C1R05 (**Tabla XV**).

Comparación	Péptidos	Valores medios de susceptibilidad a ERAP1			
P50/LG2		P-2	P-1	P-2+P-1	P1
RI>3	70/49	24.1/28.3	53.5/42.8	77.5/70.1	27.9/16.5
	Cociente	0.9	1.3	1.1	1.7
RI>1.0-3.0	57/62	28.5/34.1	47.2/45.2	74.2/78.5	24.1/19.8
	Cociente	0.8	1	1	1.2
C1R05/LG2					
RI>3	101/52	37.5/34.9	42.5/43.3	78.9/78.2	28.4/17.0
	Cociente	1.1	1	1	1.7
RI>1.0-3.0	50/52	30.3/37.4	46.6/40.9	76.3/78.3	26.4/23.4
	Cociente	0.8	1.1	1	1.1
P50/C1R05					
RI>3	74/63	36.1/34.6	41.9/39.6	77.2/73.3	29.7/29.0
	Cociente	1	1.1	1.1	1
RI>1.0-3.0	76/61	31.5/37.5	46.2/47.8	77.1/84.1	23.5/26.6
	Cociente	0.8	1	0.9	0.9

Tabla XV. Influencia de la secuencia N-terminal en la expresión de ligandos de HLA-B*27:05 en diferentes contextos de ERAP1. Se muestran los valores medios de susceptibilidad para las posiciones flanqueantes (P-2 y P-1) y P1 para cada comparación y en los dos subconjuntos de RI. Los valores que alcanzaron significación estadística se subrayaron.

Para precisar la naturaleza de este efecto, los residuos en P1 se clasificaron en tres categorías en función de su susceptibilidad: alta (valores ≥ 50), media (valores $<50 > 10$) y baja (valores ≤ 10). Los péptidos con RI>3 en las comparaciones LG2/P50 y LG2/C1R05 mostraron diferencias significativas en el uso de residuos con susceptibilidad media y baja. En el contexto de la variante de ERAP1 más activa, presente en LG2, los residuos P1 con susceptibilidad baja fueron los más frecuentes (**Figura 15 A-B**). Para las variantes menos activas, P50 y C1R05, los residuos más frecuentes en P1, en comparación con LG2, fueron los de susceptibilidad media. Cuando se comparó la distribución de residuos entre C1R05 y P50 no hubo prácticamente diferencias (**Figura 15 C**).

Estos resultados muestran que el polimorfismo K528R de ERAP1 altera el patrón de expresión del peptidoma de HLA-B*27:05 en base a una hidrólisis diferencial de residuos P1 con distinto grado de susceptibilidad. Los residuos con alta susceptibilidad a ERAP1 son hidrolizados de manera similar por variantes con actividad dispar, influyendo poco en la expresión diferencial de los ligandos correspondientes. Los residuos con susceptibilidad media son más

fácilmente degradados por variantes más activas (K528), lo que genera una sobrerepresentación de este tipo de ligandos en contextos de ERAP1 menos activos (R528). Los residuos de susceptibilidad baja se encuentran con mayor frecuencia en contextos de ERAP1 más activos debido a su dificultad para ser degradados, incluso por las variantes más activas, que sin embargo, destruyen más extensamente los ligandos con residuos P1 fácilmente hidrolizables.

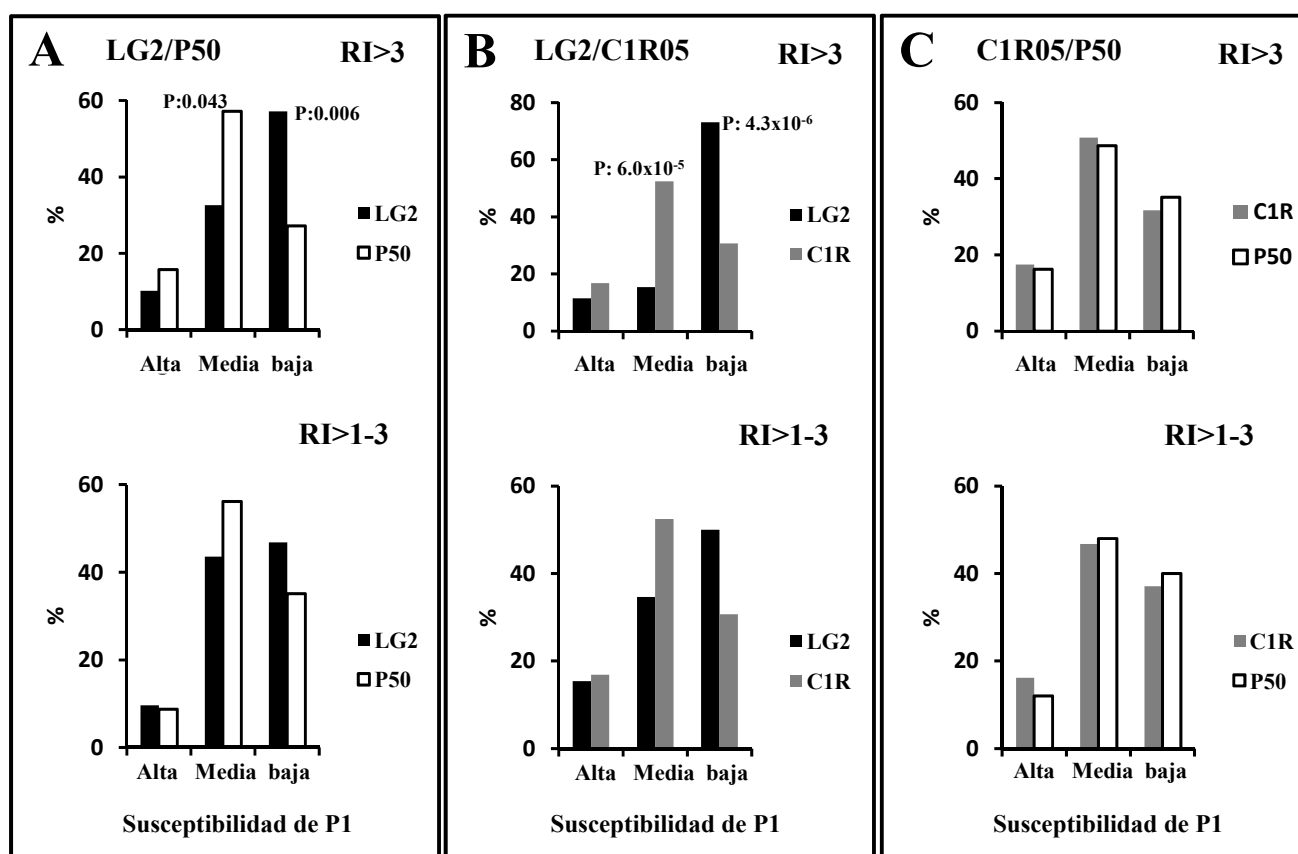


Figura 15. Susceptibilidad a la hidrólisis por ERAP1 de los residuos en P1 de ligandos de HLA-B*27:05 distribuidos en tres categorías, alta (A, C, L, M, Y), media (F, G, H, I, N, Q, S, T) y baja susceptibilidad (D, E, K, P, R, V, W). Panel A: frecuencia de residuos en P1 para las líneas LG2 y P50 en RI>3 y RI>1-3. Se indican las diferencias estadísticamente significativas determinadas por el test de χ^2 . Panel B: frecuencia de residuos en P1 para las líneas LG2 y C1R05 en RI>3 y RI>1-3. Se indican las diferencias estadísticamente significativas determinadas por el test de χ^2 . Panel C: frecuencia de residuos en P1 para las líneas C1R05 y P50 en RI>3 y RI>1-3.

Por último, al analizar la contribución de las posiciones internas y C-terminal de los ligandos sobre la hidrólisis por ERAP1, no se observaron diferencias sobre la expresión de ligandos de HLA-B*27:05 en ninguna comparación (Tabla XVI).

Comparación	Posición del residuo estudiado								
LG2/C1R05	N	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	Promedio P3-P9
Cociente RI >3.0	34/50	1.2	0.5	1.4	1.0	1.2	0.9	1.0	1.0
Cociente RI > 1.0-3.0	42/29	1.1	2.0	0.5	1.1	0.7	1.3	1.1	1.1
LG2/C1R05	N	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	Promedio P3-P9
Cociente RI >3.0	36/73	1.2	0.6	0.7	0.7	2.3	1.9	1.0	1.0
Cociente RI > 1.0-3.0	38/36	0.8	0.7	1.9	0.9	0.9	1.2	1.0	1.0
P50/C1R05	N	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	Promedio P3-P9
Cociente RI >3.0	46/45	1.0	0.9	0.9	1.0	0.9	1.0	1.0	1.0
Cociente 3 RI > 1.0-3.0	50/43	1.3	1.9	3.9	0.8	0.6	0.9	1.0	1.1

Tabla XVI. Influencia de la secuencia interna en la expresión de nonámeros de HLA-B*27:04 en el contexto de variantes diferenciales de ERAP1. En las columnas segunda a octava se muestran los valores medios de susceptibilidad de los residuos en cada posición. En la novena columna se muestra el promedio de la susceptibilidad de los residuos en las posiciones P3 a P9. Se calculó la relación de la susceptibilidad promedio para cada posición y para el promedio desde P3 a P9. N: N° de nonámeros en cada subconjunto y línea celular.

R.2.3.2. El polimorfismo K528R en ERAP1 configura el peptidoma de HLA-B*27:05 mediante un uso diferencial de residuos en múltiples posiciones de los ligandos

Como se demostró en el apartado R.2.2.2., las diferencias de peso molecular observadas entre ligandos de HLA-B*27:05 en función del polimorfismo de ERAP1 son independientes de la longitud de los péptidos. Para determinar la base de estas diferencias, se analizaron los nonámeros del subconjunto de RI>3 en las comparaciones LG2/P50 y LG2/C1R05 que constituían el 70% de los péptidos secuenciados (**Figura 16 A**). El peso molecular medio de estos péptidos en LG2 y P50 fue de 1107.6 Da y 1060.5 Da respectivamente, dando una diferencia de 46.8 Da. Esta diferencia de masa se debía al diferente tamaño medio de los residuos P1, P3, P4, P8 y P9 (**Figura 16 B**). En la comparación LG2/C1R05 el peso molecular medio de los nonámeros en LG2 y C1R05 fue de 1138.8 Da y 1081.5 Da respectivamente, lo que implica una diferencia de 57.3 Da. En este caso la contribución principal fue de la posición P1 que daba cuenta del 52% (29.8 Da) de la diferencia total. El mismo análisis entre P50 y C1R05 reveló que los pesos moleculares medios fueron de 1070.7 Da y 1071.7 Da respectivamente.

Estos resultados muestran que aunque la mayor aportación a la diferencia de peso molecular de ligandos de HLA-B*27:05 inducida por el polimorfismo de ERAP1 se debe a la selección diferencial de residuos en P1, otras posiciones del ligando también contribuyen significativamente. La tendencia general muestra la utilización preferente de ligandos con residuos más masivos en el contexto de K528 (LG2).

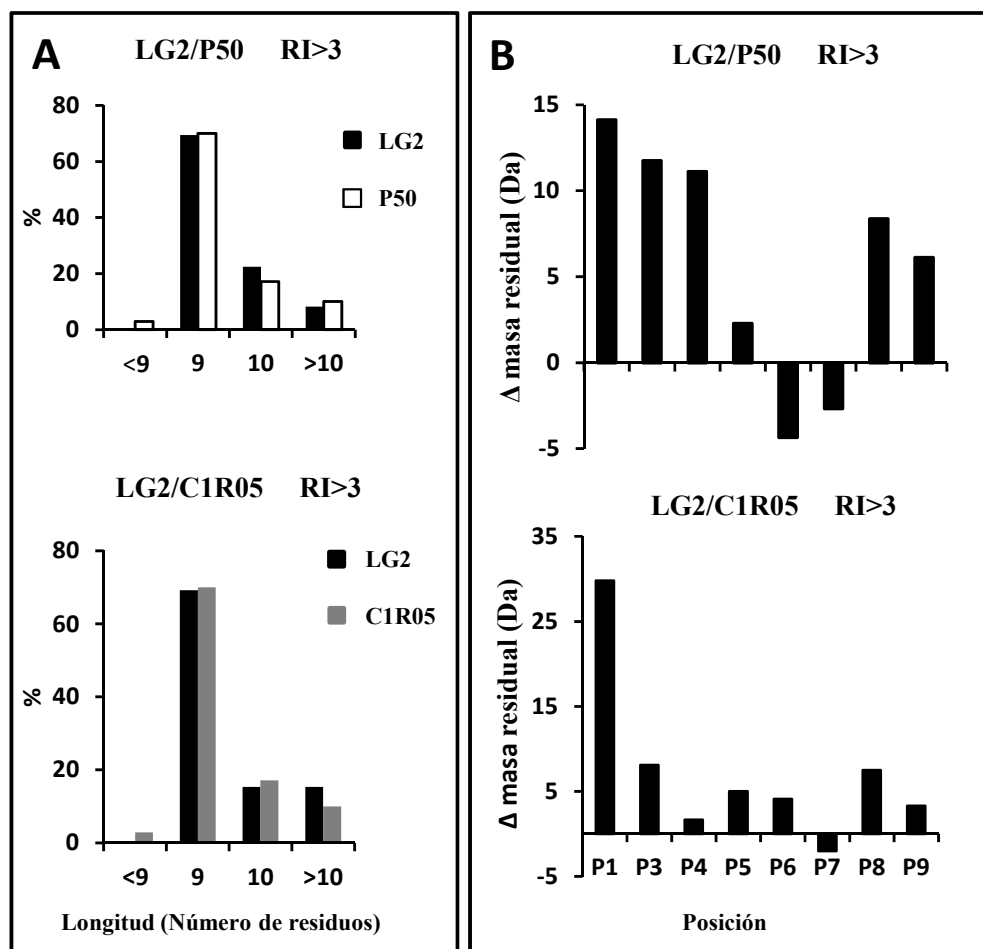


Figura 16. Distribución de longitudes y de la masa residual en ligandos de HLA-B*27:05 en los subconjunto de RI>3 en las comparaciones indicadas. (A) distribución de los ligandos predominantes secuenciados para las comparaciones LG2/P50 (arriba) y LG2/C1R05 (abajo). (B) diferencia de la masa residual media en cada posición del ligando en la comparación LG2/P50 (arriba) y LG2/C1R05 (abajo). P2 no se tuvo en cuenta porque todos los ligandos presentaron Arg en dicha posición.

R.2.4. Resumen

Los resultados concernientes al papel del polimorfismo de ERAP1 sobre el peptidoma de HLA-B*27:05 muestran un efecto dominante del polimorfismo K528R, al menos en conjunción con R127P, respecto al polimorfismo en las posiciones 575/725. Este efecto consiste en una expresión preferencial de péptidos de peso molecular más alto en el contexto K528, sin efectos sustanciales en la longitud peptídica. Las diferencias de peso molecular observadas se debieron a la selección de péptidos con cadenas laterales de mayor tamaño en P1 y otras posiciones internas de los ligandos. El mecanismo por el que el polimorfismo K528R de ERAP1 modula el peptidoma de HLA-B*27:05 es, principalmente, por una degradación diferencial de los ligandos en función de la susceptibilidad de los residuos P1 y de la actividad enzimática de las variantes de ERAP1. Así la degradación más extensa de péptidos con residuos P1 altamente susceptibles a ERAP1 por la variante más activa (K528) resulta en un predominio de péptidos con residuos P1 resistentes en dicho contexto, relativa a otro de menor actividad (R528).

R.3. Influencia diferencial de ERAP1 sobre el peptidoma de subtipos de HLA-B*27 con distinta termoestabilidad y asociación a espondilitis anquilosante

Entre los subtipos más frecuentes de HLA-B*27, HLA-B*27:02, 04, 05 y 07 están asociados a EA y HLA-B*27:06 y 09 no lo están. Esta diferenciación es casi concordante con la termoestabilidad de cada subtipo (Galocha *et al.*, 2010): alta para HLA-B*27:02, 04, 05 y baja para HLA-B*27:06, 07, 09. Por otro lado la ausencia de ERAP1 afecta a los niveles de expresión en superficie de HLA-B*27 en los subtipos asociados a EA pero no en los no asociados (Haroon *et al.*, 2012). Esto sugiere una dependencia distinta de dichos subtipos respecto a ERAP1. Para analizar esta cuestión se realizó un análisis comparativo de la susceptibilidad a ERAP1 de los residuos P1 en los peptidomas de los distintos subtipos de HLA-B*27, obtenidos en un estudio de inmunopeptidómica (*Apéndice III*) de los repertorios peptídicos aislados de los transfectantes de los distintos subtipos en C1R (García-Medel *et al.*, 2014).

Los péptidos secuenciados de cada subtipo se clasificaron atendiendo a su presencia exclusiva en uno o más subtipos asociados o no a EA o en los subtipos de alta o baja termoestabilidad. Se identificaron 1167 y 227 péptidos presentes en uno o más subtipos asociados (HLA-B*27:02, 04, 05 y 07) y no asociados a EA (HLA-B*27:06 y 09) respectivamente. Asimismo, 988 y 313 péptidos fueron exclusivamente hallados en uno o más de los subtipos de alta (HLA-B*27:02, 04, y 05) y baja (HLA-B*27:06, 07 y 09) termoestabilidad, respectivamente (**Tabla XVII**). A continuación se comparó la susceptibilidad global a ERAP1 de los residuos flanqueantes (P-1 y P-2) y P1 de los péptidos encontrados en cada uno de estos grupos. Esta comparación se centró en la frecuencia de residuos altamente susceptibles a la hidrólisis por ERAP1 (valores >50: Y, M, L, A y C) y aquellos con muy baja susceptibilidad (valores <10: E, D, V, W, K, R y P). La frecuencia de residuos flanqueantes y P1 con alta susceptibilidad fue muy similar tanto para los subtipos asociados como los no asociados a EA (**Figura 17A**). Sin embargo, los péptidos encontrados solamente en los subtipos asociados a EA mostraron un incremento estadísticamente significativo de residuos P1 con baja susceptibilidad (resistentes) respecto a los no asociados a EA (**Figura 17B**). Cuando este mismo análisis se realizó en función de la termoestabilidad, se observaron las mismas tendencias, con un incremento estadísticamente significativo para los residuos P1 resistentes, en los subtipos con alta termoestabilidad (**Figura 17C-D**). Se analizó si dicha diferencia podría recaer en alguna población de péptidos en función de su longitud. Se observó que las diferencias recaían fundamentalmente en los péptidos de 9 residuos y menores (**Figura 17E-F**). Por otra parte, la relación entre el porcentaje de residuos P1 resistentes y susceptibles a ERAP1 entre los péptidos asociados a EA o con alta termoestabilidad fue de 1.5, relación que se incrementó a 1.9 cuando se consideraron únicamente los no ámeros y longitudes menores. Sin embargo, entre los péptidos hallados únicamente en los subtipos no asociados a EA o de baja termoestabilidad las frecuencias de residuos P1 de alta o baja susceptibilidad a ERAP1 fueron similares (**Tabla XVII**).

En su conjunto estos resultados indican una influencia diferencial de ERAP1 sobre los peptidomas de los subtipos asociados a EA y de alta termoestabilidad, respecto a los no asociados a EA y baja termoestabilidad. El patrón de influencia es análogo al que se observa entre los ligandos de HLA-B*27:04 y 05 en distintos contextos de ERAP1: predominio de residuos P1 resistentes en un contexto de alta actividad de ERAP1 (secciones **R1** y **R2**). Por tanto, los péptidos presentados exclusivamente por los subtipos asociados a EA y alta termoestabilidad parecen ser más dependientes de ERAP1 que los péptidos exclusivos de subtipos no asociados a EA y de baja termoestabilidad

	Nº péptidos	Resistentes (%)	Susceptibles (%)	Cociente
Subtipos				
Asociados a EA	1167	28.4	19.4	1.5
≤9-meros	616	30.8	16.1	1.9
No asociados a EA	227	19.4	23.3	0.8
≤9-meros	191	17.3	24.1	0.7
Alta termoestabilidad	988	29.7	19.3	1.5
≤9-meros	526	32.3	16.9	1.9
Baja termoestabilidad	313	18.5	22.7	0.8
≤9-meros	244	18	22.5	0.8

Tabla XVII. Susceptibilidad a ERAP1 de los residuos P1 de los péptidos encontrados selectivamente entre los subtipos de HLA-B*27 con diferente termoestabilidad o asociación a enfermedad. Los datos representan el porcentaje (%) de residuos con valores de susceptibilidad <10 (resistentes), >50 (susceptibles) y el cociente entre resistentes y susceptibles. Los valores en negrita muestran un incremento en la frecuencia de residuos resistentes vs susceptibles. Nº de péptidos: longitudes comprendidas entre 7 y 15 residuos.

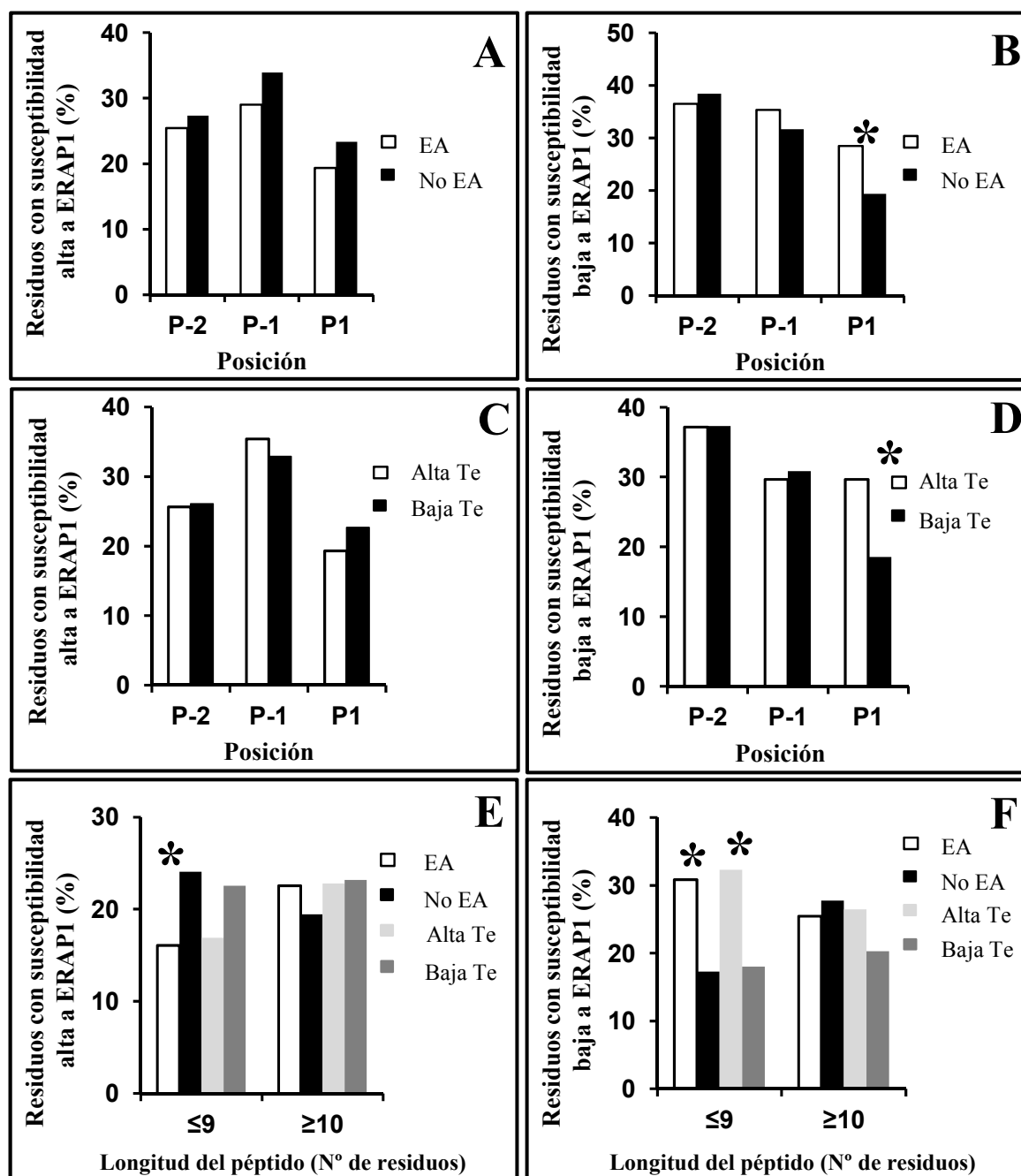


Figura 17. Susceptibilidad de P1 y de los residuos flanqueantes P-2 y P-1 a ERAP1 en los péptidos encontrados selectivamente en los subtipos de HLA-B*27 con asociación diferencial a EA o alta y baja termoestabilidad. (A) Frecuencia de los residuos altamente susceptibles (valores >50) en los subtipos asociados (barras blancas) y no asociados a EA (barras negras). (B) Frecuencia de los residuos de baja susceptibilidad (valores <10) para los subtipos de ambos grupos. * indica una diferencia estadísticamente significativa ($p: 6.2 \times 10^{-3}$). (C) Frecuencia de los residuos de alta susceptibilidad para los subtipos de alta (barras blancas) y baja termoestabilidad (barras negras). (D) Frecuencia de los residuos de baja susceptibilidad para los subtipos de ambos grupos. * indica una diferencia estadísticamente significativa ($p: 1.4 \times 10^{-4}$). (E) Frecuencia de los P1 susceptibles en los péptidos encontrados selectivamente entre los subtipos asociados (barras blancas) y no asociados a EA (barras negras), alta termoestabilidad (barras gris claro) y baja termoestabilidad (barras gris oscuro). Los péptidos se clasificaron por su longitud como ≤9-meros o ≥10-meros. * indica una diferencia estadísticamente significativa ($p: 1.6 \times 10^{-2}$). (F) frecuencia de residuos en P1 con baja susceptibilidad de los mismos conjuntos de péptidos del panel E. * indica una diferencia estadísticamente significativa (de izquierda a derecha, $p: 3.5 \times 10^{-4}$ y 5.6×10^{-5}).

R.4. influencia del polimorfismo de ERAP1 en la afinidad de los ligandos de HLA-B*27:04 y 05

Debido al efecto descrito en esta Tesis de una variante poco activa de ERAP1 sobre la termoestabilidad de HLA-B*27:04, y a la influencia de ERAP1 en la secuencia de los ligandos de HLA-B*27:05, se planteó la posibilidad de que pudieran haber diferencias en la afinidad de los péptidos presentados en diferentes contextos de ERAP1. Para eliminar la influencia de la disparidad en longitud, se comparó la afinidad global de los nonámeros predominantes en las comparaciones de HLA-B*27:04 y 05 en distintos contextos de ERAP1. Las comparaciones escogidas para el análisis fueron cuatro: C1R05 vs P50, LG2 vs C1R05, LG2 vs P50 y JSL vs We-I. Se compararon las afinidades globales de los péptidos con una $RI > 3$, $RI > 1-3$ y $RI > 1$ (**Figura 18**). El cálculo de la afinidad de cada péptido por su subtipo se realizó utilizando los algoritmos proporcionados por el portal web *CBS Prediction Servers* (Karosiene et al., 2012). El análisis estadístico se realizó usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Se observaron diferencias significativas de afinidad en HLA-B*27:05 para la comparación LG2 vs C1R05 y LG2 vs P50 y en HLA B*27:04 para JSL vs We-I en los subconjuntos $RI > 3$. Por tanto los resultados muestran una correlación clara entre nonámeros presentados en contextos de ERAP1 más activos y una mayor afinidad para el subconjunto con $RI > 3$ (**Figura 18A**). Esto sugiere que ERAP1 optimiza la afinidad del peptidoma en función de su actividad. En el subconjunto de nonámeros de expresión similar, no se observaron diferencias significativas de afinidad (**Figura 18B**).

Por último se analizaron todos los nonámeros con $RI > 1$ para ver si las diferencias encontradas en el subconjunto de $RI > 3$ serían suficientes como para alterar la afinidad global de toda la población. Se observó que para las comparaciones LG2 vs P50 y LG2 vs C1R05 el efecto era tan fuerte que se reflejó en una alteración de la afinidad global de todos los nonámeros con $RI > 1$. Este efecto no se observó en la comparación JSL vs We-I que incluía un número menor de péptidos (**Figura 17C**). Una correlación entre los polimorfismos de las variantes de ERAP1 y su efecto sobre la afinidad de los peptidomas sugiere que el polimorfismo K528R/R127P es el principal responsable de este efecto (**Tabla XVIII**).

Residuo de ERAP1	Mayor afinidad por HLA-B*27		Menor afinidad por HLA-B*27		
	JSL	LG2	We-I	P50	C1R05
127	R	R	P	P	P
276	I	I	I	I	M
346	G	G	G	G	G
349	M	M	V	V	M
528	K	K	R	R	R
575	D	D	N	N	D
725	R	R	Q	Q	R
730	Q	E	E	E	E

Tabla XVIII. Relación entre el polimorfismo de ERAP1 y su efecto en la afinidad de los ligandos de HLA-B*27:04 y 05. La optimización de la afinidad se correlaciona con la presencia de R127/K528. A la izquierda se enumeran los polimorfismos de ERAP1 más importantes en el contexto de su asociación a EA.

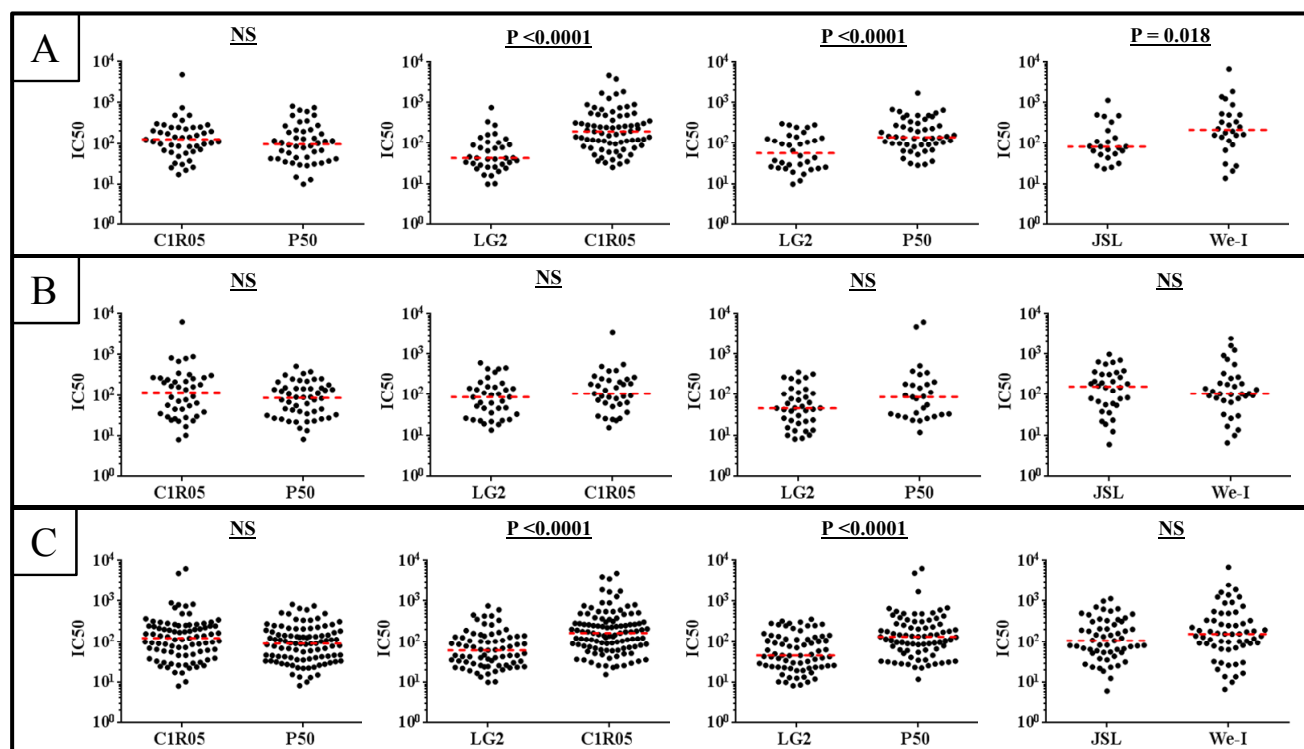


Figura18. Afinidad teórica de nonámeros predominantes en las comparaciones entre las líneas celulares utilizadas en función de su abundancia relativa. La línea roja discontinua sitúa el valor de la mediana. Las diferencias estadísticamente significativas en el test de Mann Whitney se indican con el valor de la “p” correspondiente. Las diferencias no significativas también se indicaron (NS) (A). Afinidad de los nonámeros en los subconjuntos de RI>3. (B) Afinidad de los nonámeros en los subconjuntos de RI>1-3. (C) Afinidad de los nonámeros en los subconjuntos de RI>1.

Discusión

En esta Tesis se ha investigado el efecto de variantes naturales de ERAP1 con polimorfismos asociados a EA sobre el peptidoma de HLA-B*27 en células vivas, para analizar efectos globales provocados por la enzima que pudieran afectar a la presentación antigénica u otras propiedades de la molécula de MHC-I. El interés de este estudio radica en la asociación epistática de ERAP1 y HLA-B*27 con EA (WTCC Consortium, 2007; The TASK and WTCCC2 Consortia, 2011), por ello parece razonable pensar que la influencia de ERAP1 sobre el peptidoma de HLA-B*27 tiene un papel patogénico y está en la base de la asociación conjunta de ambas moléculas a enfermedad. La mayoría de los trabajos previos se han centrado en la digestión de precursores de ligandos individuales *in vitro*, utilizando enzimas recombinantes, o dirigidos directamente al RE (Reeves *et al.*, 2013; Martin-Esteban *et al.*, 2014). Tan solo un estudio abordó el efecto de la ausencia de ERAP1 sobre el peptidoma de HLA-B*27 en células vivas (Chen *et al.*, 2014) y ninguno ha analizado previamente los efectos del polimorfismo de esta enzima sobre dicho peptidoma.

D.1. Consideraciones metodológicas

La estrategia experimental utilizada en esta Tesis tiene las siguientes características: 1) se analizaron cambios globales en el peptidoma, enfocados en las alteraciones de los niveles de expresión de péptidos. No se persiguió la identificación de péptidos generados específicamente en un contexto determinado de ERAP1, 2) se razonó que los efectos del polimorfismo de ERAP1 sobre el peptidoma de HLA-B*27 serían particularmente claros entre los subconjuntos peptídicos con mayores diferencias en su nivel de expresión entre líneas celulares, por lo que los peptidomas fueron comparados, no globalmente sino en función de los niveles de expresión relativos de los péptidos, 3) el mecanismo por el cual el polimorfismo de ERAP1 configura el peptidoma de HLA-B*27 se analizó secuenciando conjuntos de péptidos con expresión diferencial en distintos contextos de ERAP1 y comparando sus características estructurales.

D.1.1. Estimación de cambios globales en el peptidoma de HLA-B*27

Para estos análisis se usó la espectrometría de masas de MALDI-TOF, porque permite evaluar cambios globales en los niveles de expresión de un gran número de ligandos. Puesto que no es una técnica cuantitativa, debido a que la intensidad de un ión depende de múltiples factores además de su abundancia en la muestra, no es apropiada para cuantificar el nivel de expresión de péptidos individuales. Sin embargo, colectivamente, sí hay una correlación entre las intensidades de los iones y el nivel de expresión de sus péptidos respectivos, por lo que constituye una aproximación adecuada para caracterizar alteraciones colectivas en el nivel de expresión de grandes conjuntos peptídicos. Este hecho es patente en la consistencia interna de los resultados obtenidos en esta Tesis. En un trabajo reciente de nuestro laboratorio (Martin-Esteban *et al.*, 2014) se analizaron comparativamente las cantidades relativas de una mezcla de péptidos estimadas por MALDI-TOF y por absorbancia tras su fraccionamiento cromatográfico por HPLC, y los valores obtenidos fueron muy concordantes.

La búsqueda de péptidos específicos presentados en diferentes contextos de ERAP1 se descartó por varios motivos. El principal es que la no detección de un ión por MS no implica la ausencia del péptido correspondiente, porque dicha detección puede verse afectada por múltiples factores. Este problema ha sido discutido en detalle en otros estudios (Alvarez-Navarro et al., 2013; Schittenhelm et al., 2014). Por otro lado, más allá de la influencia cualitativa sobre epítomos individuales es preciso considerar que los efectos de ERAP1 sobre el peptidoma pueden ser en gran medida, cuantitativos, afectando los niveles de expresión de muchos ligandos. Sin embargo, esta cuestión no se había abordado previamente.

D.1.2. Clasificación del peptidoma en base a la abundancia relativa de los ligandos en distintas líneas celulares

Muchos factores pueden determinar diferencias en el nivel de expresión de un péptido en dos líneas celulares, por ejemplo, los niveles de expresión de la proteína parental, diferencias en la actividad metabólica, en la maquinaria de procesamiento de proteínas, etc. Sin embargo, se razonó que estos factores difícilmente mostrarían patrones de diferencias consistentes con la acción diferencial de una aminopeptidasa de las características de ERAP1. Si el polimorfismo de esta enzima juega un papel significativo en la configuración del peptidoma de HLA-B*27 esperaríamos encontrar alteraciones en los niveles de expresión de péptidos en distintos contextos de esta enzima de acuerdo a patrones consistentes con su mecanismo de acción. En cambio, las diferencias de expresión de péptidos en contextos de ERAP1 similares no presentarían dichos patrones.

Asimismo se razonó que el efecto de ERAP1 debería revelarse particularmente al comparar péptidos cuya abundancia relativa en dos contextos diferentes de ERAP1 fuera lo más dispar posible mientras que entre péptidos de expresión similar dichos efectos serían probablemente menos patentes.

Dada la naturaleza no cuantitativa del MALDI-TOF, se decidió establecer una subclasificación muy general que incluyera un gran número de péptidos en cada subconjunto, con objeto de evaluar mejor los comportamientos colectivos. El umbral más alto se estableció en una $RI > 3$ que, de forma general, distingue poblaciones de péptidos en los que hay diferencias significativas de expresión. Se estableció asimismo un rango intermedio $RI > 1.5-3$ para incluir péptidos con diferencias de expresión menos acusadas. Finalmente, el subconjunto con $RI > 1-1.5$ incluía los ligandos de expresión similar en los contextos comparados.

Los subconjuntos con $RI > 3$ constituyeron en nuestro estudio aproximadamente entre el 15 y 30% del peptidoma de HLA-B*27 en una línea celular dada. Efectivamente, de acuerdo a nuestra hipótesis de trabajo, fue en las comparaciones entre estos subconjuntos donde se revelaron con más claridad patrones de características peptídicas diferenciales –peso molecular, longitud, uso de residuos P1, etc- consistentes con la actividad dispar de variantes de ERAP1. Puesto que, sobre todo en contextos de ERAP1 con grandes diferencias de actividad, dichos patrones peptídicos diferenciales se observaron también en el rango de RI intermedio ($>1.5-3$), que incluye asimismo alrededor del 20 al 40% de un peptidoma dado, concluimos que el polimorfismo de ERAP1

afecta de manera significativa al nivel de expresión de un gran número de ligandos de HLA-B*27. Aun así, los péptidos de expresión similar, en diferentes contextos (RI>1-1-5), constituyen aproximadamente del 25 al 50% del peptidoma de HLA-B*27. Esto denota que para muchos ligandos de HLA-B*27 la acción de variantes de ERAP1 con diferente actividad enzimática no tiene consecuencias en sus niveles de expresión. Esto puede deberse a múltiples factores. Por ejemplo, muchos de los ligando pueden llegar al RE con el tamaño definitivo para ser cargados por HLA-B*27 sin requerir de ningún procesamiento ulterior. De hecho, los ligando naturales de esta molécula muestran generalmente mayor afinidad por TAP que sus precursores N-terminales (García-Medel *et al.*, 2014). Además, variantes de ERAP1 con actividades muy dispares pueden producir la misma cantidad final de un ligando debido a que una mayor actividad puede, en muchos casos, no solo generar mejor un ligando sino también destruirlo más extensamente. Una variante menos activa generaría peor un ligando pero también lo destruiría menos. Este efecto compensatorio en el balance generación/destrucción se ha demostrado *in vitro* en un estudio de nuestro laboratorio (Martín-Esteban *et al.*, 2014).

D.2. Mecanismo de interacción funcional entre ERAP1 y HLA-B*27

Las bases de la interacción funcional entre ambas moléculas hay que buscarlas, lógicamente, partiendo de la especificidad peptídica de HLA-B*27 y de las características que definen la actividad enzimática de ERAP1. Al igual que otras moléculas del MHC-I humano, HLA-B*27 une fundamentalmente nonámeros, una proporción considerablemente menor de péptidos mayores, entre los que predominan los decámeros, y un porcentaje muy bajo de octámeros. La inmensa mayoría de los ligandos de HLA-B*27 (>95%) poseen Arg en posición 2 (Jardetzky *et al.*, 1991; Ben Dror *et al.*, 2010). Por otra parte, ERAP1, debido al mecanismo de “regla molecular” (Chang *et al.*, 2005) degrada los precursores amino-terminales de los ligandos del MHC-I eficientemente hasta un tamaño de 9 residuos pero, en función de la actividad de las variantes concretas de esta enzima, los nonámeros pueden ser también digeridos a octámeros, que prácticamente ya no son hidrolizados. En el caso de HLA-B*27, la hidrólisis del residuo P1 de un ligando natural destruye el motivo peptídico de Arg en posición 2 y, en la mayoría de los casos, incapacita al péptido resultante para unirse a HLA-B*27. Por tanto, el rendimiento final de un ligando procesado por ERAP1 será el resultado del balance entre su generación y su destrucción por esta enzima. ERAP1 puede hidrolizar la práctica totalidad de los residuos N-terminales, excepto Pro y cualquier residuo que la preceda, sin embargo la eficiencia de corte varía ampliamente en función del residuo (Hearn *et al.*, 2009). Por tanto, distintas variantes de ERAP1 hidrolizan los residuos N-terminales de manera muy diferente. La interacción funcional de esta enzima con HLA-B*27 se sustenta en el equilibrio entre la capacidad de generación y destrucción de ligandos, que viene dada por la susceptibilidad de las secuencias flanqueantes y del residuo P1, respectivamente, y que está condicionada por la actividad enzimática de cada variante de ERAP1. Los residuos flanqueantes en P-3 y posiciones más alejadas pueden ser eliminados por múltiples peptidasas *in vivo*, pero P-2 y P-1 son predominantemente eliminados por ERAP1 en el RE (Schatz *et al.*, 2008). Por este motivo se decidió analizar la susceptibilidad en los dos residuos flanqueantes N-terminales

como factor implicado en la producción de los ligandos de HLA-B*27.

Como se ha mencionado en la Introducción, la actividad hidrolítica de ERAP1 requiere una transición conformacional desde un estado abierto, inactivo, a uno cerrado, activo. Esta transición es inducida por la unión del sustrato a un sitio regulador topológicamente diferente del sitio catalítico. La afinidad de esta unión determina la transición al estado activo (Chang *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2011; Kochan *et al.*, 2011). Por tanto, la eficiencia de la hidrólisis por ERAP1 no solo depende de la naturaleza de los residuos N-terminales sino también del resto de la secuencia del sustrato, puesto que ésta determina la afinidad de unión al sitio regulador. Por otra parte, los polimorfismos funcionales de ERAP1 pueden, en virtud de su localización en la estructura tridimensional de la molécula (**Figura 19**), afectar directamente al sitio catalítico (P.ej., la posición 349), pero también a la estructura del sitio regulador (P.ej. las posiciones 725 y 730) y a la flexibilidad de las regiones interdominio implicadas en la transición conformacional (P.ej. la posición 528). La consecuencia de este complejo escenario es que los efectos del polimorfismo de ERAP1 sobre el peptidoma de MHC-I y, en concreto, de HLA-B*27 pueden manifestarse a múltiples niveles, todos los cuales se han revelado en esta Tesis: 1) efectos sobre la longitud de los ligandos, 2) efectos sobre la naturaleza del residuo P1 y 3) efectos sobre la selección de residuos internos en la secuencia del ligando. Los tres tipos de efectos implican potencialmente alteraciones globales en el peso molecular de los ligandos, las cuales pueden, sin embargo reflejar distintos mecanismos subyacentes como se discute más detalladamente a continuación.

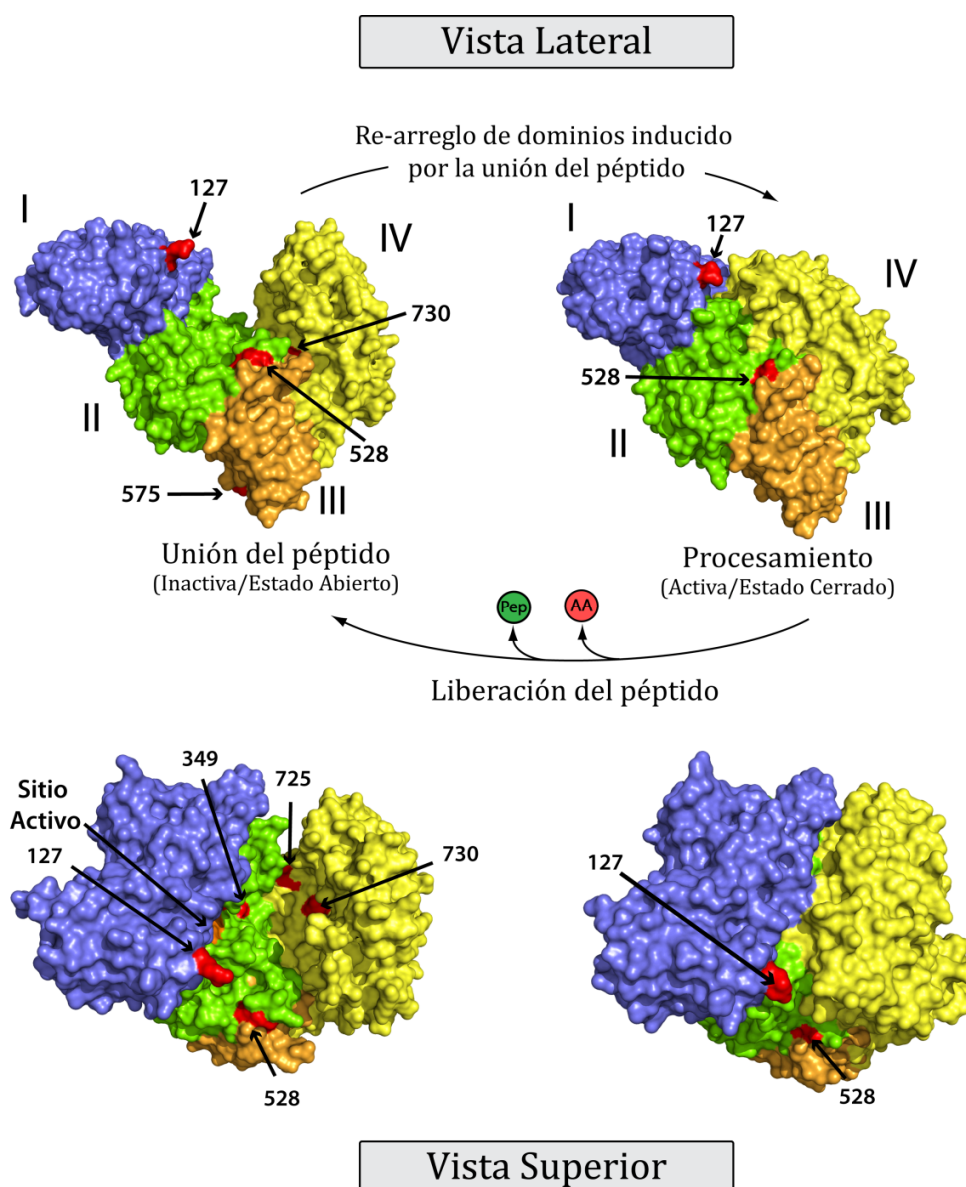


Figura 19. Estructura y topología de los residuos asociados a EA de ERAP1. La parte superior representa una vista lateral de la enzima. Se muestra la localización de las posiciones polimórficas, 127, 528 y 575 en sus respectivos dominios. La parte inferior representa una vista vertical de ERAP1. Se muestra la localización de las posiciones 127, 349, 528, 725 y 730 en sus respectivos dominios. (Alvarez-Navarro and Lopez de Castro, 2014).

D.3. El papel del polimorfismo de ERAP1 en la configuración de los peptidomas de HLA-B*27:04 y 05

Inicialmente resultó desconcertante el hecho de que, en las comparaciones de los peptidomas de HLA-B*27:04, los péptidos predominantes en el contexto más activo de ERAP1 (JSL, C1R04) mostraban un peso molecular medio menor que los predominantes en un contexto menos activo (We-I), mientras que en HLA-B*27:05 se dio la situación inversa: los péptidos de mayor peso molecular predominaban en el contexto más

activo (LG2). Los análisis posteriores basados en las secuencias de péptidos de los subconjuntos de RI>3 revelaron las causas de esta paradoja: mientras que en HLA-B*27:04 la variante más activa de ERAP1 producía fundamentalmente péptidos de menor longitud, en HLA-B*27:05 los efectos de las diferencias de actividad enzimática no afectaron significativamente a la longitud de los ligandos sino, fundamentalmente al tamaño de los residuos peptídicos. Debe señalarse, sin embargo que un efecto de ERAP1 sobre la secuencia peptídica, independiente de la longitud, se observó también entre los ligandos de HLA-B*27:04.

La causa de estos efectos diferenciales en ambos peptidomas deben buscarse en las distintas variantes de ERAP1 empleados en ambos estudios y en el efecto diferencial de las mismas sobre los residuos flanqueantes (P-2 y P-1) y P1 de los ligandos. En general es razonable suponer que en un contexto más activo un número de péptidos más alto se procesarán hasta el tamaño óptimo de 9 aminoácidos, en relación a un contexto de menor actividad, como efectivamente se observó en HLA-B*27:04 y quedó patente en la mayor susceptibilidad de los residuos flanqueantes de sus ligandos en el contexto de la variante menos activa de ERAP1. Este efecto, sin embargo, puede ser en parte compensado por una mayor destrucción de noámeros por las variantes más activas.

Una característica que explicaría en parte los efectos observados sobre la longitud es la diferencia entre JSL y We-I en la posición 730 (Q/E), puesto podría afectar a la eficiencia hidrolítica de ERAP1 de manera diferente dependiendo de la longitud del sustrato (comunicación personal de Efstratios Stratikos). Sin embargo, este polimorfismo no es el único determinante, puesto que también se observó un efecto diferencial sobre la longitud, aunque menos acusado, entre C1R04 y We-I cuyas variantes en ERAP1 no difieren en esta posición.

El papel del polimorfismo Q730E en determinar la longitud de los ligandos de HLA-B*27 viene apoyado adicionalmente por nuestros resultados en HLA-B*27:05. En este caso las diferencias en los polimorfismos entre la variante más activa (LG2) y la menos activa (P50) son las mismas que entre JLS y We-I excepto por la identidad en la posición 730 (E). Sin embargo, estos polimorfismos y la diferencia de actividad no se tradujeron en diferencias globales en la longitud de los ligandos predominantes en ambos contextos.

Las diferencias de peso molecular independientes de la longitud, reflejan un efecto del polimorfismo de ERAP1 sobre las secuencias peptídicas. Este efecto se ejerció tanto en HLA-B*27:04 como en HLA-B*27:05 a dos niveles: sobre la selección del residuo P1 y sobre la selección de residuos internos.

En HLA-B*27:04 y 05 se observó una mayor frecuencia de residuos P1 resistentes a ERAP1 entre los ligandos más abundantes en el contexto de mayor actividad enzimática. Como se ha mencionado, ello es consecuencia de una degradación más eficiente de los ligandos con residuos P1 susceptibles, en comparación con una variante de ERAP1 menos activa. Por tanto, un mecanismo de destrucción diferencial de ligandos de HLA-B*27 en función de la actividad de ERAP1 explica en gran parte el efecto modulador de esta enzima. Sin embargo, esta modulación implica también a residuos internos en la secuencia de los ligandos, que fueron seleccionados diferencialmente en base al tamaño de sus cadenas laterales en los distintos contextos de ERAP1. Este efecto fue particularmente evidente en la comparación del tamaño de los residuos internos entre los noámeros de HLA-B*27:04 y 05 pertenecientes a los subconjuntos RI>3. En HLA-B*27:04, el efecto principal

se observó en P4, donde los péptidos predominantes en el contexto menos activo (We-I) presentaron residuos de mayor tamaño. En cambio, entre los ligandos de HLA-B*27:05 se observó un incremento del tamaño de los residuos P3, P4 y en menor medida, P8 y P9 en el contexto más activo (LG2). Estos efectos se explican en base a la unión diferencial de los sustratos en el sitio regulador de ERAP1 y al efecto de esta unión sobre la activación de las distintas variantes de ERAP1. La unión del sustrato al sitio regulador con afinidad adecuada es un requisito para inducir la transición conformacional de la enzima al estado activo. Por tanto, polimorfismos de ERAP1 que afecten al tamaño y/o polaridad del sitio regulador, determinaran la naturaleza de los ligandos que puedan acomodarse mejor para su procesamiento. Una correlación clara entre los efectos observados sobre la secuencia de los ligandos y la estructura de cada variante de ERAP1 no es fácil de establecer con precisión porque no se dispone de la estructura cristalina de ERAP1 en complejo con un sustrato peptídico y por tanto no se conocen los detalles de las interacciones enzima/sustrato en el sitio regulador de la enzima. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que los efectos del polimorfismo de ERAP1 sobre la selección de las secuencias de los ligandos de HLA-B*27, independientemente de sus efectos sobre la longitud de los mismos, son significativos y varían en función de la estructura de cada variante enzimática.

D.4. Polimorfismo de ERAP1 y afinidad del peptidoma de HLA-B*27

La ausencia de ERAP1 genera complejos pMHC menos estables (Hammer *et al.*, 2007). Análogamente, los resultados obtenidos en We-I demuestran que una variante poco activa de ERAP1 puede afectar a la estabilidad de HLA-B*27, presumiblemente por su incapacidad para generar un repertorio óptimo de ligandos potenciales. Estas observaciones nos llevaron a plantear si los polimorfismos funcionales de ERAP1 generarían una fracción de péptidos predominantes que tuvieran distinta afinidad por HLA-B*27. Los resultados mostraron que los nonámeros de HLA-B*27:04 y 05 predominantes en los contextos más activos de ERAP1 tenían una afinidad superior. Esto implica que las variantes más activas de la enzima optimizan la afinidad del peptidoma por efectos dependientes de la longitud peptídica en HLA-B*27:04 (mayor frecuencia de nonámeros) e independientes de la longitud en ambos subtipos. Dicha optimización se correlaciona con el polimorfismo K528, un residuo clave en la asociación a EA (WTCC Consortium, 2007; Harvey *et al.*, 2009b; The TASK and WTCCC2 Consortia, 2011) y cuyo efecto potenciador de la actividad enzimática es bien conocido (Goto *et al.*, 2006; Reeves *et al.*, 2013; Martin-Esteban *et al.*, 2014).

Al menos en parte, el incremento de afinidad inducido por las variantes más activas de ERAP1, que contienen polimorfismos de riesgo para EA, se basa en el efecto de éstas sobre la frecuencia de residuos P1 resistentes a la hidrólisis, principalmente residuos básicos, puesto que éstos contribuyen positivamente a la afinidad peptídica en virtud de su interacción con E163 en HLA-B*27 (Hillig *et al.*, 2004).

La afinidad de los péptidos por su molécula presentadora influye en las etapas finales del plegamiento en el RE, en la estabilidad del complejo pMHC-I (Galocha *et al.*, 2010) y en la vida media de dichos complejos en superficie. Por tanto, las variantes de ERAP1 que alteren la afinidad de un conjunto significativo de péptidos

podrían afectar a características globales de HLA-B*27 y a su potencial patogénico, como se discute más adelante (Apdo D.7.)

D.5. Interacción diferencial entre ERAP1 y subtipos de HLA-B*27 asociados diferencialmente a espondilitis anquilosante

Puesto que la asociación de ERAP1 con EA solo se da en individuos HLA-B27⁺ (The TASK and WTCCC2 Consortia, 2011) cabe preguntarse si los efectos de esta enzima sobre los subtipos asociados y no asociados a enfermedad son o no similares. El análisis de la distribución de residuos P1 resistentes y susceptibles a ERAP1 realizado en esta Tesis sobre ligandos de múltiples subtipos de HLA-B*27 mostró que la frecuencia de los residuos P1 resistentes a ERAP1 fue casi el doble que la de los de alta susceptibilidad en los subtipos asociados a EA y de alta termoestabilidad, mientras que en los subtipos no asociados a EA y de baja termoestabilidad dicha relación fue, si acaso, ligeramente favorable a los residuos más susceptibles. Por tanto, parece haber un efecto diferencial de ERAP1 sobre los peptidomas de ambos grupos de subtipos, que se correlaciona con la asociación a enfermedad y con la estabilidad global de sus peptidomas.

Una posible explicación de este hecho diferencial radica en la relación existente entre la cinética de plegamiento de HLA-B*27 y la optimización de su repertorio peptídico. Los subtipos asociados a EA, excepto HLA-B*27:07, optimizan el repertorio mediante la acción de la tapasina, con muy alta estabilidad y se pliegan lentamente. En cambio, los subtipos no asociados a EA, HLA-B*27:06 y 09, se pliegan y son exportados a la superficie celular mucho más rápidamente pero con repertorios peptídicos subóptimos, lo que se refleja en su menor termoestabilidad (Galocha *et al.*, 2010). El plegamiento rápido está probablemente motivado por la mayor hidrofobicidad y otras características estructurales de la subcavidad F, que imponen una carga peptídica más rápida para estabilizar la molécula, evitando en gran medida la optimización del repertorio peptídico por tapasina. El rápido plegamiento de los subtipos no asociados a EA y de baja termoestabilidad favorecería la carga de péptidos con vida media corta o larga en el RE. Dado que la vida media de un ligando en el RE viene determinada fundamentalmente por la susceptibilidad a la hidrólisis de su residuo P1, el hecho de que la relación entre residuos P1 resistentes y altamente susceptibles sea similar sugiere la ausencia de un sesgo en el peptidoma introducido por ERAP1 en estos subtipos.

Por el contrario, el lento plegamiento de los subtipos asociados a EA y de alta termoestabilidad favorece presumiblemente la unión de péptidos con alta vida media en el RE, que preferentemente serán aquellos que tengan residuos P1 resistentes a la acción hidrolítica de ERAP1. Esta misma explicación da cuenta de la distribución diferencial de longitudes peptídicas observadas en los peptidomas de ambos grupos de subtipos (García-Medel *et al.*, 2014) (*Apéndice III, figura 4*).

Nuestras observaciones relativas al efecto de ERAP1 en los subtipos diferencialmente asociados a EA concuerdan con un trabajo previo (Haroon *et al.*, 2012) en el que la inhibición de la expresión de ERAP1 indujo

una disminución de la expresión en superficie de los subtipos asociados a EA (HLA-B*27:04 y 05), pero no afectó a los subtipos no asociados a esta enfermedad (HLA-B*27:06 y 09). Asimismo, la inhibición de la expresión de ERAP1 disminuyó la frecuencia de ligandos de HLA-B*27:05 con residuos P1 resistentes a ERAP1 y aumentó la de los péptidos con residuos P1 de susceptibilidad media-alta en otro estudio (Chen *et al.*, 2014).

D.6. Convergencia funcional entre la asociación diferencial de variantes de ERAP1 y subtipos de HLA-B*27 a espondilitis anquilosante

Los resultados de esta Tesis muestran que los polimorfismos de ERAP1 asociados a riesgo de EA, principalmente K528, inducen un predominio de péptidos con ligandos P1 resistentes a la hidrólisis y una optimización de la afinidad, mientras que las variantes con polimorfismos protectores presentan predominantemente ligandos con una mayor frecuencia de residuos P1 con susceptibilidad media-alta y una afinidad menor. Por otro lado, los subtipos de HLA-B*27 asociados a EA presentan igualmente un predominio de residuos P1 resistentes a ERAP1 y alta estabilidad molecular mientras que los no asociados a enfermedad discriminan poco entre las susceptibilidades de diferentes residuos en esta posición y tienen menor termoestabilidad. Por tanto existe una similitud de efectos sobre la configuración y afinidad del peptidoma que se relacionan con la asociación tanto de HLA-B*27 como de ERAP1 a EA. Dicha similitud sugiere además, que los subtipos de HLA-B*27 asociados a EA son más dependientes de ERAP1 que los no asociados a enfermedad.

D.7. Modulación del potencial patogénico de HLA-B*27 por ERAP1

La asociación epistática de ERAP1 y HLA-B*27 en la EA se explica por los efectos significativos del polimorfismo de esta enzima sobre el peptidoma de HLA-B*27, cuya naturaleza y mecanismo molecular se han definido en esta Tesis. Sin embargo, el alcance de estos cambios es tal que no nos permite, en el estado actual de nuestro conocimiento, decantarnos por una de las múltiples alternativas por las que el peptidoma de HLA-B*27 determina el potencial patogénico de esta molécula. A continuación se resume la posible influencia de ERAP1 sobre las propiedades de HLA-B*27 que se consideran, en el marco de las hipótesis vigentes, como potencialmente patogénicas:

1.- Alteración de las propiedades inmunológicas de HLA-B*27. Variantes de ERAP1 con diferente actividad podrían determinar la presentación o no de péptidos específicos con capacidad de generar respuestas autoinmunes, como se propone en la hipótesis del *péptido artritogénico* (Benjamin *et al.*, 1990). Aunque este punto concreto no se ha investigado aquí, parece claro que el polimorfismo de ERAP1, en base a los efectos observados, podría determinar la generación diferencial de epítomos. Por otro lado, una alteración global de las cantidades de muchos péptidos, como la observada en esta Tesis, puede alterar el potencial tolerogénico y autoinmune de HLA-B*27, puesto que la selección del repertorio T depende de la avidez de las interacciones

pMHC/TCR (Manz et al., 2011; Stewart-Jones et al., 2012).

2.- Alteraciones en el plegamiento de HLA-B*27. La disponibilidad de un repertorio potencial de ligandos de alta afinidad por HLA-B*27, tal como se genera en el contexto de variantes más activas de ERAP1, favorecería la optimización del repertorio mediada por tapasina, generando complejos pMHC muy estables mediante un plegamiento lento, que favorece la acumulación de HC mal plegada en el RE (Mear et al., 1999; Dangoria et al., 2002). La respuesta provocada por proteína mal plegada en el RE, se activa para aliviar el estrés producido por tal acumulación y conlleva la activación de la producción de IL23 y de la respuesta pro-inflamatoria asociada a esta citocina (Layh-Schmitt and Colbert, 2008; DeLay et al., 2009). Por tanto, diferencias en la actividad de ERAP1 podrían afectar a la cinética de plegamiento de HLA-B*27 y, por esta vía, modular su potencial pro-inflamatorio con independencia de una presentación específica de antígeno.

3.-Formación de homodímeros de HC en la superficie celular. Una fracción relativamente pequeña de las moléculas de HLA-B*27 que alcanzan la superficie celular da lugar a la formación de homodímeros de HC (Allen et al., 1999) en un proceso que requiere reciclamiento endosomal y, presumiblemente, disociación de complejos pMHC (Bird et al., 2003). Este proceso es importante porque los homodímeros de HC pueden ser reconocidos por receptores leucocitarios y, en particular por KIR3DL2 (Chan et al., 2005). Una subpoblación de células Th17 que expresa este receptor está aumentada en pacientes con EA (Bowness et al., 2011b). Dicha subpoblación se activa reconociendo homodímeros de HC de HLA-B*27 y produce la citocina proinflamatoria IL17. El efecto de las variantes más activas de ERAP1 sobre la optimización de la afinidad del peptidoma de HLA-B*27 debería traducirse en una mayor estabilidad de los complejos pMHC y por tanto mayor vida media en superficie y mayor reciclamiento endosomal, de manera que el incremento de afinidad inducido por las variantes más activas de ERAP1 podría aumentar el nivel de expresión de homodímeros de HC en superficie. Ello conllevaría una producción más elevada de IL17 y, por esta vía, se potenciaría igualmente la capacidad proinflamatoria de HLA-B*27. Dado que la EA se da en un marco de inflamación con niveles elevados de TNF, y estos aumentan la expresión de EHD1 (comunicación personal de Jaime Millán), una proteína implicada en el reciclamiento endosomal de MHC-I (Caplan et al., 2002), es posible que en este marco exista una mayor probabilidad de que los complejos HLA-B*27/péptido con vida media larga puedan generar homodímeros debido a un mayor reciclamiento endosomal, exacerbando a su vez el proceso inflamatorio.

Lo múltiples efectos que las alteraciones en el peptidoma pueden tener sobre el potencial patogénico de HLA-B*27 no son excluyentes y podrían darse simultáneamente. Este hecho revela a la vez la importancia y la complejidad de la interacción funcional entre ERAP1 y HLA-B*27 en la patogenia de la EA.

D.8. ERAP1 y la patogenia de enfermedades asociadas a MHC-I

Los resultados de esta Tesis constituyen el primer análisis molecular sistemático de los efectos y mecanismo de acción del polimorfismo de ERAP1 sobre una molécula de MHC-I asociada a enfermedad. La naturaleza y magnitud de estos efectos revelan que ERAP1 puede alterar la especificidad inmunológica y el

potencial proinflamatorio de la molécula de MHC-I a múltiples niveles y sugieren que la idea de que ERAP1 se asocia a enfermedad mediante su capacidad de generar o no un antígeno específico podría ser excesivamente simplista. Como se ha mencionado, ERAP1 es un factor de riesgo en al menos otras dos enfermedades asociadas a MHC-I, psoriasis y enfermedad de Behçet, y está en epistasis con los alelos del MHC-I de susceptibilidad correspondientes en ambos casos. Ello sugiere la existencia de mecanismos patogénicos subyacentes y dependientes del peptidoma con un grado substancial de similitud entre estas dos enfermedades y la EA. En estudios futuros será necesario determinar el efecto de ERAP1 sobre otros peptidomas relevantes en enfermedades asociadas al MHC-I y evaluar cuantitativamente los efectos de estas alteraciones, no solo en la especificidad de presentación antigénica, sino también en otras propiedades potencialmente patogénicas. Es probable que estudios comparativos de la biología molecular de la interacción MHC-I/ERAP1 en enfermedad nos proporcionen una visión unificada del papel patogénico de HLA-B*27 y otras moléculas en las enfermedades asociadas a MHC-I, así como de la patogenia misma de estas enfermedades.

Conclusiones

- 1) Las variantes naturales de ERAP1 presentan diferencias significativas en su actividad enzimática.
- 2) El polimorfismo de ERAP1 tiene efectos globales sobre el peptidoma de HLA-B*27, afectando al nivel de expresión, peso molecular, longitud, secuencia y afinidad de un gran número de ligandos.
- 3) Los polimorfismos de ERAP1 asociados a un riesgo incrementado de espondilitis anquilosante inducen una mayor actividad enzimática y generan peptidomas de longitud y afinidad más optimizadas que las variantes de ERAP1 con polimorfismos protectores.
- 4) Entre los polimorfismos de ERAP1 asociados con espondilitis anquilosante, la mutación K528R tiene un efecto predominante en la configuración del peptidoma de HLA-B*27:05.
- 5) El mecanismo de interacción funcional entre ERAP1 y HLA-B*27 se basa en el balance entre la generación y destrucción de ligandos, que es distinto para cada variante de la enzima y dependiente de cada péptido individual.
- 6) El balance entre la generación y destrucción de ligandos por las variantes de ERAP1 está determinado por la susceptibilidad de los residuos flanqueantes N-terminales y del residuo P1 a la hidrólisis. Esto se traduce en una mayor abundancia de péptidos con residuos P1 básicos, resistentes a ERAP1, en contextos más activos de esta enzima.
- 7) Hay una influencia diferencial de ERAP1 sobre los subtipos asociados y no asociados a espondilitis anquilosante. El patrón de frecuencias de residuos P1 de alta y baja susceptibilidad a ERAP1 en subtipos asociados y no asociados a enfermedad es similar al que muestra HLA-B*27:05 en el contexto de variantes de esta enzima con alta y baja actividad, respectivamente.
- 8) Esta observación sugiere que los subtipos no asociados a espondilitis anquilosante están menos influidos por el polimorfismo funcional de ERAP1 que los subtipos asociados a enfermedad.
- 9) La magnitud de los efectos del polimorfismo de ERAP1 indica que esta enzima puede alterar no solo la presentación de antígenos específicos sino también propiedades biológicas globales de HLA-B*27 que dependen de la afinidad del peptidoma.
- 10) La asociación conjunta de HLA-B*27 y ERAP1 a espondilitis anquilosante se explica asumiendo que los péptidos juegan un papel patogénico esencial y que los efectos substanciales de ERAP1 sobre el peptidoma, caracterizados en esta Tesis, alteran el potencial proinflamatorio y/o autoinmune de HLA-B*27.

Referencias

1. Allen,R.L., O'Callaghan,C.A., McMichael,A.J., and Bowness,P. (1999). Cutting edge: HLA-B27 can form a novel β 2-microglobulin-free heavy chain homodimer structure. *J. Immunol.*, 162, 5045-5048.
2. Alvarez,I., Martí,M., Vazquez,J., Camafeita,E., Ogueta,S., and Lopez de Castro,J.A. (2001a). The Cys-67 residue of HLA-B27 influences cell surface stability, peptide specificity, and T-cell antigen presentation. *J. Biol. Chem.*, 276, 48740-48747.
3. Alvarez,I., Sesma,L., Marcilla,M., Ramos,M., Martí,M., Camafeita,E., and Lopez de Castro,J.A. (2001b). Identification of Novel HLA-B27 Ligands Derived from Polymorphic Regions of its own or Other Class I Molecules Based on Direct Generation by 20S Proteasome. *J. Biol. Chem.*, 276, 32729-32737.
4. Alvarez-Navarro,C., Cragnolini,J.J., Dos Santos,H.G., Barnea,E., Admon,A., Morreale,A., and Lopez de Castro,J.A. (2013). Novel HLA-B27-restricted epitopes from Chlamydia trachomatis generated upon endogenous processing of bacterial proteins suggest a role of molecular mimicry in reactive arthritis. *J. Biol. Chem.*, 288, 25810-25825.
5. Alvarez-Navarro,C. and Lopez de Castro,J.A. (2014). ERAP1 structure, function and pathogenetic role in ankylosing spondylitis and other MHC-associated diseases. *Mol. Immunol.*, 57, 12-21.
6. Andres,A.M., Dennis,M.Y., Kretzschmar,W.W., Cannons,J.L., Lee-Lin,S.Q., Hurle,B., Schwartzberg,P.L., Williamson,S.H., Bustamante,C.D., Nielsen,R., Clark,A.G., and Green,E.D. (2010). Balancing selection maintains a form of ERAP2 that undergoes nonsense-mediated decay and affects antigen presentation. *PLoS. Genet.*, 6, e1001157.
7. Arendt,C.S. and Hochstrasser,M. (1997). Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94, 7156-7161.
8. Barnstable,C.J., Bodmer,W.F., Brown,G., Galfre,G., Milstein,C., Williams,A.F., and Ziegler,A. (1978). Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens. New tools for genetic analysis. *Cell*, 14, 9-20.
9. Ben Dror,L., Barnea,E., Beer,I., Mann,M., and Admon,A. (2010). The HLA-B*2705 peptidome. *Arthritis Rheum.*, 62, 420-429.
10. Benham,A.M., Gromme,M., and Neefjes,J. (1998). Allelic differences in the relationship between proteasome activity and MHC class I peptide loading. *J. Immunol.*, 161, 83-89.
11. Beninga,J., Rock,K.L., and Goldberg,A.L. (1998). Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N-terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J. Biol. Chem.*, 273, 18734-18742.
12. Benjamin,R. and Parham,P. (1990). Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol. Today*, 11, 137-142.
13. Benjamin,R.J., Madrigal,J.A., and Parham,P. (1991). Peptide binding to empty HLA-B27 molecules of viable human cells. *Nature*, 351, 74-77.
14. Bird,L.A., Peh,C.A., Kollnberger,S., Elliott,T., McMichael,A.J., and Bowness,P. (2003). Lymphoblastoid cells express HLA-B27 homodimers both intracellularly and at the cell surface following endosomal recycling. *Eur. J. Immunol.*, 33, 748-759.
15. Birtley,J.R., Saridakis,E., Stratikos,E., and Mavridis,I.M. (2012). The crystal structure of human endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 reveals the atomic basis for distinct roles in antigen processing. *Biochemistry*, 51, 286-295.
16. Bjorkman,P.J., Saper,M.A., Samraoui,B., Bennett,W.S., Strominger,J.L., and Wiley,D.C. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*, 329, 506-512.

17. Boes,B., Hengel,H., Ruppert,T., Multhaup,G., Koszinowski,U.H., and Kloetzel,P.M. (1994). Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. *J. Exp. Med.*, 179, 901-909.
18. Bouvier,M. and Wiley,D.C. (1994). Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. *Science*, 265, 398-402.
19. Bowness,P., Ridley,A., Shaw,J., Chan,A.T., Wong-Baeza,I., Fleming,M., Cummings,F., McMichael,A., and Kollnberger,S. (2011b). Th17 cells expressing KIR3DL2+ and responsive to HLA-B27 homodimers are increased in ankylosing spondylitis. *J. Immunol.*, 186, 2672-2680.
20. Bowness,P., Ridley,A., Shaw,J., Chan,A.T., Wong-Baeza,I., Fleming,M., Cummings,F., McMichael,A., and Kollnberger,S. (2011a). Th17 cells expressing KIR3DL2+ and responsive to HLA-B27 homodimers are increased in ankylosing spondylitis. *J. Immunol.*, 186, 2672-2680.
21. Brewerton,D.A., Caffrey,M., Nicholls,A., Walters,D., Oates,J.K., and James,D.C. (1973a). Reiter's disease and HL-A 27. *Lancet*, 2, 996-998.
22. Brewerton,D.A., Hart,F.D., Nicholls,A., Caffrey,M., James,D.C., and Sturrock,R.D. (1973b). Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet*, 1, 904-907.
23. Brown,M.A. (2008). Breakthroughs in genetic studies of ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)*, 47, 132-137.
24. Calvo,V., Rojo,S., Lopez,D., Galocha,B., and Lopez de Castro,J.A. (1990). Structure and diversity of HLA-B27-specific T cell epitopes. Analysis with site-directed mutants mimicking HLA-B27 subtype polymorphism. *J. Immunol.*, 144, 4038-4045.
25. Caplan,S., Naslavsky,N., Hartnell,L.M., Lodge,R., Polishchuk,R.S., Donaldson,J.G., and Bonifacino,J.S. (2002). A tubular EHD1-containing compartment involved in the recycling of major histocompatibility complex class I molecules to the plasma membrane. *EMBO J.*, 21, 2557-2567.
26. Chan,A.T., Kollnberger,S.D., Wedderburn,L.R., and Bowness,P. (2005). Expansion and enhanced survival of natural killer cells expressing the killer immunoglobulin-like receptor KIR3DL2 in spondylarthritis. *Arthritis Rheum.*, 52, 3586-3595.
27. Chang,S.C., Momburg,F., Bhutani,N., and Goldberg,A.L. (2005). The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a "molecular ruler" mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102, 17107-17112.
28. Chen,L., Fischer,R., Peng,Y., Reeves,E., McHugh,K., Ternette,N., Hanke,T., Dong,T., Elliott,T., Shastri,N., Kollnberger,S., James,E., Kessler,B., and Bowness,P. (2014). Critical role of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 in determining the length and sequence of peptides bound and presented by HLA-B27. *Arthritis Rheumatol.*, 66, 284-294.
29. Choi,C.B., Kim,T.H., Jun,J.B., Lee,H.S., Shim,S.C., Lee,B., Pope,A., Uddin,M., Rahman,P., and Inman,R.D. (2010). ARTS1 polymorphisms are associated with ankylosing spondylitis in Koreans. *Ann. Rheum. Dis.*, 69, 582-584.
30. Colbert,R.A. (2000a). HLA-B27 misfolding and spondyloarthropathies: not so groovy after all? *J. Rheumatol.*, 27, 1107-1109.
31. Colbert,R.A. (2000b). HLA-B27 misfolding: a solution to the spondyloarthropathy conundrum? *Mol. Med. Today*, 6, 224-230.
32. Colbert,R.A., Tran,T.M., and Layh-Schmitt,G. (2014). HLA-B27 misfolding and ankylosing spondylitis. *Mol. Immunol.*, 57, 44-51.

33. Cortes,A., Hadler,J., Pointon,J.P., Robinson,P.C., Karaderi,T., Leo,P., Cremin,K., Pryce,K., Harris,J., Lee,S., Joo,K.B., Shim,S.C., Weisman,M., Ward,M., Zhou,X., Garchon,H.J., Chiocchia,G., Nossent,J., Lie,B.A., Forre,O., Tuomilehto,J., Laiho,K., Jiang,L., Liu,Y., Wu,X., Bradbury,L.A., Elewaut,D., Burgos-Vargas,R., Stebbings,S., Appleton,L., Farrah,C., Lau,J., Kenna,T.J., Haroon,N., Ferreira,M.A., Yang,J., Mulero,J., Fernandez-Sueiro,J.L., Gonzalez-Gay,M.A., Lopez-Larrea,C., Deloukas,P., Donnelly,P., Bowness,P., Gafney,K., Gaston,H., Gladman,D.D., Rahman,P., Maksymowych,W.P., Xu,H., Crusius,J.B., van der Horst-Bruinsma IE, Chou,C.T., Valle-Onate,R., Romero-Sanchez,C., Hansen,I.M., Pimentel-Santos,F.M., Inman,R.D., Videm,V., Martin,J., Breban,M., Reveille,J.D., Evans,D.M., Kim,T.H., Wordsworth,B.P., and Brown,M.A. (2013). Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nat. Genet.*, 45, 730-738.
34. Coux,O., Tanaka,K., and Goldberg,A.L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 801-847.
35. Craiu,A., Akopian,T., Goldberg,A., and Rock,K.L. (1997a). Two distinct proteolytic processes in the generation of a major histocompatibility complex class I-presented peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94, 10850-10855.
36. Craiu,A., Gaczynska,M., Akopian,T., Gramm,C.F., Fenteany,G., Goldberg,A.L., and Rock,K.L. (1997b). Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *J. Biol. Chem.*, 272, 13437-13445.
37. Dangoria,N.S., DeLay,M.L., Kingsbury,D.J., Mear,J.P., Uchanska-Ziegler,B., Ziegler,A., and Colbert,R.A. (2002). HLA-B27 misfolding is associated with aberrant intermolecular disulfide bond formation (dimerization) in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, 277, 23459-23468.
38. de la Salle,H., Hanau,D., Fricker,D., Urlacher,A., Kelly,A., Salamero,J., Powis,S.H., Donato,L., Bausinger,H., and Laforet,M. (1994). Homozygous human TAP peptide transporter mutation in HLA class I deficiency. *Science*, 265, 237-241.
39. DeLay,M.L., Turner,M.J., Klenk,E.I., Smith,J.A., Sowders,D.P., and Colbert,R.A. (2009). HLA-B27 misfolding and the unfolded protein response augment interleukin-23 production and are associated with Th17 activation in transgenic rats
7. Arthritis Rheum., 60, 2633-2643.
40. Dick,L.R., Moomaw,C.R., DeMartino,G.N., and Slaughter,C.A. (1991). Degradation of oxidized insulin B chain by the multiproteinase complex macropain (proteasome). *Biochemistry*, 30, 2725-2734.
41. Dick,T.P., Bangia,N., Peaper,D.R., and Cresswell,P. (2002). Disulfide bond isomerization and the assembly of MHC class I-peptide complexes. *Immunity.*, 16, 87-98.
42. Dong,G., Wearsch,P.A., Peaper,D.R., Cresswell,P., and Reinisch,K.M. (2009). Insights into MHC class I peptide loading from the structure of the tapasin-ERp57 thiol oxidoreductase heterodimer. *Immunity.*, 30, 21-32.
43. Eggers,M., Boes-Fabian,B., Ruppert,T., Kloetzel,P.M., and Koszinowski,U.H. (1995). The cleavage preference of the proteasome governs the yield of antigenic peptides. *J. Exp. Med.*, 182, 1865-1870.
44. Ellis,S.A., Taylor,C., and McMichael,A. (1982). Recognition of HLA-B27 and related antigens by a monoclonal antibody. *Hum. Immunol.*, 5, 49-59.

45. Evnouchidou,I., Kamal,R.P., Seregin,S.S., Goto,Y., Tsujimoto,M., Hattori,A., Voulgari,P.V., Drosos,A.A., Amalfitano,A., York,I.A., and Stratikos,E. (2011). Cutting Edge: Coding single nucleotide polymorphisms of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 can affect antigenic peptide generation in vitro by influencing basic enzymatic properties of the enzyme. *J. Immunol.*, 186, 1909-1913.
46. Evnouchidou,I., Momburg,F., Papakyriakou,A., Chroni,A., Leondiadis,L., Chang,S.C., Goldberg,A.L., and Stratikos,E. (2008). The internal sequence of the peptide-substrate determines its N-terminus trimming by ERAP1. *PLoS ONE.*, 3, e3658.
47. Evnouchidou,I., Weimershaus,M., Saveanu,L., and van Endert,P. (2014). ERAP1-ERAP2 dimerization increases peptide-trimming efficiency. *J. Immunol.*, 193, 901-908.
48. Falk,K., Rotzschke,O., and Rammensee,H.G. (1990). Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*, 348, 248-251.
49. Fung,E.Y., Smyth,D.J., Howson,J.M., Cooper,J.D., Walker,N.M., Stevens,H., Wicker,L.S., and Todd,J.A. (2009). Analysis of 17 autoimmune disease-associated variants in type 1 diabetes identifies 6q23/TNFAIP3 as a susceptibility locus. *Genes Immun.*, 10, 188-191.
50. Galocha,B. and López de Castro,J.A. (2010). Mutational Analysis Reveals a Complex Interplay of Peptide Binding and Multiple Biological Features of HLA-B27. *J. Biol. Chem.*, 285, 39180-39190.
51. Garcia,F., Marina,A., and Lopez de Castro,J.A. (1997). Lack of carboxyl-terminal tyrosine distinguishes the B*2706-bound peptide repertoire from those of B*2704 and other HLA-B27 subtypes associated to ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens*, 49, 215-221.
52. Garcia-Medel,N., Sanz-Bravo,A., Alvarez-Navarro,C., Gomez-Molina,P., Barnea,E., Marcilla,M., Admon,A., and Lopez de Castro,J.A. (2014). Peptide handling by HLA-B27 subtypes influences their biological behavior, association with ankylosing spondylitis and susceptibility to ERAP1. *Mol. Cell Proteomics.*
53. Garcia-Medel,N., Sanz-Bravo,A., Van Nguyen,D., Galocha,B., Gomez-Molina,P., Martin-Esteban,A., Alvarez-Navarro,C., and de Castro,J.A. (2012). Functional Interaction of the Ankylosing Spondylitis-associated Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 Polymorphism and HLA-B27 in Vivo. *Mol. Cell Proteomics.*, 11, 1416-1429.
54. Garrett,T.P., Saper,M.A., Bjorkman,P.J., Strominger,J.L., and Wiley,D.C. (1989). Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68. *Nature*, 342, 692-696.
55. Gil-Torregrosa,B.C., Castano A.R., and Del Val,M. (1998). Major histocompatibility complex class I viral antigen processing in the secretory pathway defined by the trans-Golgi network protease furin. *J. Exp. Med.*, 188, 1105-1116.
56. Gil-Torregrosa,B.C., Castano,A.R., Lopez,D., and Del Val,M. (2000). Generation of MHC class I peptide antigens by protein processing in the secretory route by furin. *Traffic.*, 1, 641-651.
57. Gomez,P., Montserrat,V., Marcilla,M., Paradela,A., and López de Castro,J.A. (2006). B*2707 differs in peptide specificity from B*2705 and B*2704 as much as from HLA-B27 subtypes not associated to spondyloarthritis. *Eur. J. Immunol.*, 36, 1867-1881.
58. Goto,Y., Hattori,A., Ishii,Y., and Tsujimoto,M. (2006). Reduced activity of the hypertension-associated Lys528Arg mutant of human adipocyte-derived leucine aminopeptidase (A-LAP)/ER-aminopeptidase-1. *FEBS Lett.*, 580, 1833-1838.
59. Goto,Y., Tanji,H., Hattori,A., and Tsujimoto,M. (2008). Glutamine-181 is crucial in the enzymatic activity and substrate specificity of human endoplasmic-reticulum aminopeptidase-1. *Biochem. J.*, 416, 109-116.
60. Griffin,T.A., Nandi,D., Cruz,M., Fehling,H.J., Kaer,L.V., Monaco,J.J., and Colbert,R.A. (1998). Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. *J. Exp. Med.*, 187, 97-104.

61. Groettrup,M., Standera,S., Stohwasser,R., and Kloetzel,P.M. (1997). The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94, 8970-8975.
62. Groll,M., Ditzel,L., Lowe,J., Stock,D., Bochtler,M., Bartunik,H.D., and Huber,R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, 386, 463-471.
63. Guerini,F.R., Cagliani,R., Forni,D., Agliardi,C., Caputo,D., Cassinotti,A., Galimberti,D., Fenoglio,C., Biasin,M., Asselta,R., Scarpini,E., Comi,G.P., Bresolin,N., Clerici,M., and Sironi,M. (2012). A functional variant in ERAP1 predisposes to multiple sclerosis. *PLoS. ONE.*, 7, e29931.
64. Guil,S., Rodriguez-Castro,M., Aguilar,F., Villasevil,E.M., Anton,L.C., and Del Val,M. (2006). Need for tripeptidyl-peptidase II in major histocompatibility complex class I viral antigen processing when proteasomes are detrimental. *J. Biol. Chem.*, 281, 39925-39934.
65. Guo,H.C., Jardetzky,T.S., Garrett,T.P., Lane,W.S., Strominger,J.L., and Wiley,D.C. (1992). Different length peptides bind to HLA-Aw68 similarly at their ends but bulge out in the middle. *Nature*, 360, 364-366.
66. Hammer,G.E., Gonzalez,F., James,E., Nolla,H., and Shastri,N. (2007). In the absence of aminopeptidase ERAAP, MHC class I molecules present many unstable and highly immunogenic peptides. *Nat. Immunol.*, 8, 101-108.
67. Haroon,N., Tsui,F.W., Uchanska-Ziegler,B., Ziegler,A., and Inman,R.D. (2012). Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1) exhibits functionally significant interaction with HLA-B27 and relates to subtype specificity in ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.*, 71, 589-595.
68. Harvey,D., Pointon,J.J., Evans,D.M., Karaderi,T., Farrar,C., Appleton,L.H., Sturrock,R.D., Stone,M.A., Oppermann,U., Brown,M.A., and Wordsworth,B.P. (2009a). Investigating the genetic association between ERAP1 and ankylosing spondylitis. *Hum. Mol. Genet.*, 18, 4204-4212.
69. Harvey,D., Pointon,J.J., Evans,D.M., Karaderi,T., Farrar,C., Appleton,L.H., Sturrock,R.D., Stone,M.A., Oppermann,U., Brown,M.A., and Wordsworth,B.P. (2009b). Investigating the genetic association between ERAP1 and ankylosing spondylitis. *Hum. Mol. Genet.*, 18, 4204-4212.
70. Hearn,A., York,I.A., and Rock,K.L. (2009). The specificity of trimming of MHC class I-presented peptides in the endoplasmic reticulum. *J. Immunol.*, 183, 5526-5536.
71. Heinemeyer,W., Fischer,M., Krimmer,T., Stachon,U., and Wolf,D.H. (1997). The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J. Biol. Chem.*, 272, 25200-25209.
72. Henderson,R.A., Michel,H., Sakaguchi,K., Shabanowitz,J., Appella,E., Hunt,D.F., and Engelhard,V.H. (1992). HLA-A2.1-associated peptides from a mutant cell line: a second pathway of antigen presentation. *Science*, 255, 1264-1266.
73. Hillig,R.C., Huelsmeyer,M., Saenger,W., Welfle,K., Misselwitz,R., Welfle,H., Kozerski,C., Volz,A., Uchanska-Ziegler,B., and Ziegler,A. (2004). Thermodynamic and structural analysis of peptide-and allele-dependent properties of two HLA-B27 subtypes exhibiting differential disease association. *J. Biol. Chem.*, 279, 652-663.
74. Infantes,S., Lorente,E., Barnea,E., Beer,I., Barriga,A., Lasala,F., Jimenez,M., Admon,A., and Lopez,D. (2013). Natural HLA-B*2705 protein ligands with glutamine as anchor motif: implications for HLA-B27 association with spondyloarthritis. *J. Biol. Chem.*, 288, 10882-10889.
75. Jardetzky,T.S., Lane,W.S., Robinson,R.A., Madden,D.R., and Wiley,D.C. (1991). Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature*, 353, 326-329.

76. Julia,A., Tortosa,R., Hernanz,J.M., Canete,J.D., Fonseca,E., Ferrandiz,C., Unamuno,P., Puig,L., Fernandez-Sueiro,J.L., Sanmarti,R., Rodriguez,J., Gratacos,J., Dauden,E., Sanchez-Carazo,J.L., Lopez-Estebarez,J.L., Moreno-Ramirez,D., Queiro,R., Montilla,C., Torre-Alonso,J.C., Perez-Venegas,J.J., Vanaclocha,F., Herrera,E., Munoz-Fernandez,S., Gonzalez,C., Roig,D., Erra,A., Acosta,I., Fernandez-Nebro,A., Zarco,P., Alonso,A., Lopez-Lasanta,M., Garcia-Montero,A., Gelpi,J.L., Absher,D., and Marsal,S. (2012). Risk variants for psoriasis vulgaris in a large case-control collection and association with clinical subphenotypes. *Hum. Mol. Genet.*, 21, 4549-4557.
77. Karosiene,E., Lundegaard,C., Lund,O., and Nielsen,M. (2012). NetMHCcons: a consensus method for the major histocompatibility complex class I predictions. *Immunogenetics*, 64, 177-186.
78. Kessler,J.H., Khan,S., Seifert,U., Le Gall,S., Chow,K.M., Paschen,A., Bres-Vloemans,S.A., de Ru,A., van Montfoort,N., Franken,K.L., Benckhuijsen,W.E., Brooks,J.M., van Hall,T., Ray,K., Mulder,A., Doxiadis,I.I., van Swieten,P.F., Overkleeft,H.S., Prat,A., Tomkinson,B., Neefjes,J., Kloetzel,P.M., Rodgers,D.W., Hersh,L.B., Drijfhout,J.W., van Veelen,P.A., Ossendorp,F., and Melief,C.J. (2011). Antigen processing by nardilysin and thimet oligopeptidase generates cytotoxic T cell epitopes. *Nat. Immunol.*, 12, 45-53.
79. Kiepiela,P., Leslie,A.J., Honeyborne,I., Ramduth,D., Thobakgale,C., Chetty,S., Rathnavalu,P., Moore,C., Pfafferott,K.J., Hilton,L., Zimbwa,P., Moore,S., Allen,T., Brander,C., Addo,M.M., Altfeld,M., James,I., Mallal,S., Bunce,M., Barber,L.D., Szinger,J., Day,C., Klenerman,P., Mullins,J., Korber,B., Coovadia,H.M., Walker,B.D., and Goulder,P.J. (2004). Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature*, 432, 769-775.
80. Kim,E., Kwak,H., and Ahn,K. (2009). Cytosolic aminopeptidases influence MHC class I-mediated antigen presentation in an allele-dependent manner. *J. Immunol.*, 183, 7379-7387.
81. Kloetzel,P.M. (2004). The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim. Biophys. Acta*, 1695, 225-233.
82. Kochan,G., Krojer,T., Harvey,D., Fischer,R., Chen,L., Vollmar,M., von Delft,F., Kavanagh,K.L., Brown,M.A., Bowness,P., Wordsworth,P., Kessler,B.M., and Oppermann,U. (2011). Crystal structures of the endoplasmic reticulum aminopeptidase-1 (ERAP1) reveal the molecular basis for N-terminal peptide trimming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108, 7745-7750.
83. Kollnberger,S., Bird,L.A., Roddis,M., Hacquard-Bouder,C., Kubagawa,H., Bodmer,H.C., Breban,M., McMichael,A.J., and Bowness,P. (2004). HLA-B27 heavy chain homodimers are expressed in HLA-B27 transgenic rodent models of spondyloarthritis and are ligands for paired Ig-like receptors. *J. Immunol.*, 173, 1699-1710.
84. Kollnberger,S., Chan,A., Sun,M.Y., Chen,L.Y., Wright,C., di Gleria,K., McMichael,A., and Bowness,P. (2007). Interaction of HLA-B27 homodimers with KIR3DL1 and KIR3DL2, unlike HLA-B27 heterotrimers, is independent of the sequence of bound peptide. *Eur. J. Immunol.*, 37, 1313-1322.
85. Layh-Schmitt,G. and Colbert,R.A. (2008). The interleukin-23/interleukin-17 axis in spondyloarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 20, 392-397.

86. Lin,Z., Bei,J.X., Shen,M., Li,Q., Liao,Z., Zhang,Y., Lv,Q., Wei,Q., Low,H.Q., Guo,Y.M., Cao,S., Yang,M., Hu,Z., Xu,M., Wang,X., Wei,Y., Li,L., Li,C., Li,T., Huang,J., Pan,Y., Jin,O., Wu,Y., Wu,J., Guo,Z., He,P., Hu,S., Wu,H., Song,H., Zhan,F., Liu,S., Gao,G., Liu,Z., Li,Y., Xiao,C., Li,J., Ye,Z., He,W., Liu,D., Shen,L., Huang,A., Wu,H., Tao,Y., Pan,X., Yu,B., Tai,E.S., Zeng,Y.X., Ren,E.C., Shen,Y., Liu,J., and Gu,J. (2012). A genome-wide association study in Han Chinese identifies new susceptibility loci for ankylosing spondylitis. *Nat. Genet.*, 44, 73-77.
87. Littman,D.R. (1989). Role of cell-to-cell interactions in T lymphocyte development and activation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1, 920-928.
88. Lopez de Castro,J.A., Alvarez,I., Marcilla,M., Paradela,A., Ramos,M., Sesma,L., and Vazquez,M. (2004). HLA-B27: a registry of constitutive peptide ligands. *Tissue Antigens*, 63, 424-445.
89. Lopez,D., Jimenez,M., Garcia-Calvo,M., and Del Val,M. (2011). Concerted antigen processing of a short viral antigen by human caspase-5 and -10. *J. Biol. Chem.*, 286, 16910-16913.
90. Luckey,C.J., King,G.M., Marto,J.A., Venkateswaran,S., Maier,B.F., Crotzer,V.L., Colella,T.A., Shabanowitz,J., Hunt,D.F., and Engelhard,V.H. (1998). Proteasomes can either generate or destroy MHC class I epitopes: evidence for nonproteasomal epitope generation in the cytosol. *J. Immunol.*, 161, 112-121.
91. Luckey,C.J., Marto,J.A., Partridge,M., Hall,E., White,F.M., Lippolis,J.D., Shabanowitz,J., Hunt,D.F., and Engelhard,V.H. (2001). Differences in the expression of human class I MHC alleles and their associated peptides in the presence of proteasome inhibitors. *J. Immunol.*, 167, 1212-1221.
92. Macagno,A., Gilliet,M., Sallusto,F., Lanzavecchia,A., Nestle,F.O., and Groettrup,M. (1999). Dendritic cells up-regulate immunoproteasomes and the proteasome regulator PA28 during maturation. *Eur. J. Immunol.*, 29, 4037-4042.
93. Madden,D.R. (1995). The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu. Rev. Immunol.*, 13, 587-622.
94. Madden,D.R., Garboczi,D.N., and Wiley,D.C. (1993). The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2 [published erratum appears in Cell 1994 Jan 28;76(2):following 410]. *Cell*, 75, 693-708.
95. Madden,D.R., Gorga,J.C., Strominger,J.L., and Wiley,D.C. (1992). The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell*, 70, 1035-1048.
96. Maksymowych,W.P., Inman,R.D., Gladman,D.D., Reeve,J.P., Pope,A., and Rahman,P. (2009). Association of a specific ERAP1/ARTS1 haplotype with disease susceptibility in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.*, 60, 1317-1323.
97. Manz,B.N., Jackson,B.L., Petit,R.S., Dustin,M.L., and Groves,J. (2011). T-cell triggering thresholds are modulated by the number of antigen within individual T-cell receptor clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108, 9089-9094.
98. Marcilla,M., Villasevil,E.M., and López de Castro,J.A. (2008). Tripeptidyl peptidase II is dispensable for the generation of both proteasome-dependent and proteasome-independent ligands of HLA-B27 and other class I molecules. *Eur. J. Immunol.*, 38, 631-639.
99. Martin-Esteban,A., Gomez-Molina,P., Sanz-Bravo,A., and Lopez de Castro,J.A. (2014). Combined effects of ankylosing spondylitis-associated ERAP1 polymorphisms outside the catalytic and peptide-binding sites on the processing of natural HLA-B27 ligands. *J. Biol. Chem.*, 289, 3978-3990.

100. Mear,J.P., Schreiber,K.L., Münz,C., Zhu,X., Stevanovic,S., Rammensee,H.G., Rowland-Jones,S.L., and Colbert,R.A. (1999). Misfolding of HLA-B27 as a result of its B pocket suggests a novel mechanism for its role in susceptibility to spondyloarthropathies. *J. Immunol.*, 163, 6665-6670.
101. Merino,E., Galocha,B., Vazquez,M.N., and Lopez de Castro,J.A. (2008). Disparate folding and stability of the ankylosing spondylitis-associated HLA-B*1403 and B*2705 proteins. *Arthritis Rheum.*, 58, 3693-3704.
102. Momburg,F., Roelse,J., Howard,J.C., Butcher,G.W., Hammerling,G.J., and Neefjes,J.J. (1994). Selectivity of MHC-encoded peptide transporters from human, mouse and rat. *Nature*, 367, 648-651.
103. Murata,S., Sasaki,K., Kishimoto,T., Niwa,S., Hayashi,H., Takahama,Y., and Tanaka,K. (2007). Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science*, 316, 1349-1353.
104. Nguyen,T.T., Chang,S.C., Evnouchidou,I., York,I.A., Zikos,C., Rock,K.L., Goldberg,A.L., Stratikos,E., and Stern,L.J. (2011). Structural basis for antigenic peptide precursor processing by the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 18, 604-613.
105. O'Brien,S.J., Gao,X., and Carrington,M. (2001). HLA and AIDS: a cautionary tale. *Trends Mol. Med.*, 7, 379-381.
106. Orr,H.T., Lopez de Castro,J.A., Lancet,D., and Strominger,J.L. (1979). Complete amino acid sequence of a papain-solubilized human histocompatibility antigen, HLA-B7. 2. Sequence determination and search for homologies. *Biochemistry*, 18, 5711-5720.
107. Paradela,A., Alvarez,I., Garcia-Peydro,M., Sesma,L., Ramos,M., Vazquez,J., and Lopez de Castro,J.A. (2000). Limited diversity of peptides related to an alloreactive T cell epitope in the HLA-B27-bound peptide repertoire results from restrictions at multiple steps along the processing-loading pathway. *J. Immunol.*, 164, 329-337.
108. Paradela,A., Garcia-Peydro,M., Vazquez,J., Rognan,D., and Lopez de Castro,J.A. (1998). The same natural ligand is involved in allorecognition of multiple HLA-B27 subtypes by a single T cell clone: role of peptide and the MHC molecule in alloreactivity. *J. Immunol.*, 161, 5481-5490.
109. Parmentier,N., Stroobant,V., Colau,D., de Diesbach,P., Morel,S., Chapiro,J., van Endert,P., and Van den Eynde,B.J. (2010). Production of an antigenic peptide by insulin-degrading enzyme. *Nat. Immunol.*, 11, 449-454.
110. Payeli,S.K., Kollnberger,S., Marroquin,B.O., Thiel,M., McHugh,K., Giles,J., Shaw,J., Kleber,S., Ridley,A., Wong-Baeza,I., Keidel,S., Kuroki,K., Maenaka,K., Wadle,A., Renner,C., and Bowness,P. (2012). Inhibiting HLA-B27 homodimer-driven immune cell inflammation in spondylarthritis. *Arthritis Rheum.*, 64, 3139-3149.
111. Price,P., Witt,C., Allcock,R., Sayer,D., Garlepp,M., Kok,C.C., French,M., Mallal,S., and Christiansen,F. (1999). The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases. *Immunol. Rev.*, 167, 257-274.
112. Princiotta,M.F., Finzi,D., Qian,S.B., Gibbs,J., Schuchmann,S., Buttgereit,F., Bennink,J.R., and Yewdell,J.W. (2003). Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity*, 18, 343-354.
113. Ramos,M., Paradela,A., Vazquez,M., Marina,A., Vazquez,J., and Lopez de Castro,J.A. (2002). Differential association of HLA-B*2705 and B*2709 to ankylosing spondylitis correlates with limited peptide subsets but not with altered cell surface stability. *J. Biol. Chem.*, 277, 28749-28756.
114. Reeves,E., Edwards,C.J., Elliott,T., and James,E. (2013). Naturally occurring ERAP1 haplotypes encode functionally distinct alleles with fine substrate specificity. *J. Immunol.*, 191, 35-43.

115. Reits,E.A., Vos,J.C., Gromme,M., and Neefjes,J. (2000). The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature*, 404, 774-778.
116. Reveille,J.D., Sims,A.M., Danoy,P., Evans,D.M., Leo,P., Pointon,J.J., Jin,R., Zhou,X., Bradbury,L.A., Appleton,L.H., Davis,J.C., Diekman,L., Doan,T., Dowling,A., Duan,R., Duncan,E.L., Farrar,C., Hadler,J., Harvey,D., Karaderi,T., Mogg,R., Pomeroy,E., Pryce,K., Taylor,J., Savage,L., Deloukas,P., Kumanduri,V., Peltonen,L., Ring,S.M., Whittaker,P., Glazov,E., Thomas,G.P., Maksymowych,W.P., Inman,R.D., Ward,M.M., Stone,M.A., Weisman,M.H., Wordsworth,B.P., and Brown,M.A. (2010). Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. *Nat. Genet.*, 42, 123-127.
117. Rock,K.L., Gramm,C., Rothstein,L., Clark,K., Stein,R., Dick,L., Hwang,D., and Goldberg,A.L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*, 78, 761-771.
118. Rojo,S., Garcia,F., Villadangos,J.A., and Lopez de Castro,J.A. (1993). Changes in the repertoire of peptides bound to HLA-B27 subtypes and to site-specific mutants inside and outside pocket B. *J. Exp. Med.*, 177, 613-620.
119. Ruddock,L.W. and Molinari,M. (2006). N-glycan processing in ER quality control. *J. Cell Sci.*, 119, 4373-4380.
120. Sadasivan,B., Lehner,P.J., Ortmann,B., Spies,T., and Cresswell,P. (1996). Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity*, 5, 103-114.
121. Saper,M.A., Bjorkman,P.J., and Wiley,D.C. (1991). Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 219, 277-319.
122. Saric,T., Beninga,J., Graef,C.I., Akopian,T.N., Rock,K.L., and Goldberg,A.L. (2001). Major histocompatibility complex class I-presented antigenic peptides are degraded in cytosolic extracts primarily by thimet oligopeptidase. *J. Biol. Chem.*, 276, 36474-36481.
123. Saric,T., Chang,S.C., Hattori,A., York,I.A., Markant,S., Rock,K.L., Tsujimoto,M., and Goldberg,A.L. (2002). An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat. Immunol.*, 3, 1169-1176.
124. Saveanu,L., Carroll,O., Lindo,V., Del Val,M., Lopez,D., Lepelletier,Y., Greer,F., Schomburg,L., Fruci,D., Niedermann,G., and Van Endert,P.M. (2005). Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat. Immunol.*, 6, 689-697.
125. Schatz,M.M., Peters,B., Akkad,N., Ullrich,N., Martinez,A.N., Carroll,O., Bulik,S., Rammensee,H.G., van Endert,P., Holzthutter,H.G., Tenzer,S., and Schild,H. (2008). Characterizing the N-terminal processing motif of MHC class I ligands. *J. Immunol.*, 180, 3210-3217.
126. Schittenhelm,R.B., Lim Kam Sian,T.C., Wilmann,P.G., Dudek,N.L., and Purcell,A.W. (2014). Revisiting the arthritogenic peptide theory: Quantitative not qualitative changes in the peptide repertoire of HLA-B27 allotypes. *Arthritis Rheumatol.*
127. Seifert,U., Marañón,C., Shmueli,A., Desoutter,J.F., Wesoloski,L., Janek,K., Henklein,P., Diescher,S., Andrieu,M., de la Salle,H., Weinschenk,T., Schild,H., Laderach,D., Galy,A., Haas,G., Kloetzel,P.M., Reiss,Y., and Hosmalin,A. (2003). An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nature Immunology*, 4, 375-379.
128. Serwold,T., Gaw,S., and Shastri,N. (2001). ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for MHC class I molecules. *Nat. Immunol.*, 2, 644-651.
129. Serwold,T., Gonzalez,F., Kim,J., Jacob,R., and Shastri,N. (2002). ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature*, 419, 480-483.

130. Serwold,T. and Shastri,N. (1999). Specific proteolytic cleavages limit the diversity of the pool of peptides available to MHC class I molecules in living cells. *J. Immunol.*, 162, 4712-4719.
131. Snyder,H.L., Bacik,I., Bennink,J.R., Kearns,G., Behrens,T.W., Bachi,T., Orłowski,M., and Yewdell,J.W. (1997). Two novel routes of transporter associated with antigen processing (TAP)-independent major histocompatibility complex class I antigen processing. *J. Exp. Med.*, 186, 1087-1098.
132. Stewart-Jones,G.B., Simpson,P., van der Merwe,P.A., Easterbrook,P., McMichael,A.J., Rowland-Jones,S.L., Jones,E.Y., and Gillespie,G.M. (2012). Structural features underlying T-cell receptor sensitivity to concealed MHC class I micropolymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109, E3483-E3492.
133. Stohwasser,R., Standera,S., Peters,I., Kloetzel,P.M., and Groettrup,M. (1997). Molecular cloning of the mouse proteasome subunits MC14 and MECL-1: reciprocally regulated tissue expression of interferon-gamma-modulated proteasome subunits. *Eur. J. Immunol.*, 27, 1182-1187.
134. Stoltze,L., Schirle,M., Schwarz,G., Schroter,C., Thompson,M.W., Hersh,L.B., Kalbacher,H., Stevanovic,S., Rammensee,H.G., and Schild,H. (2000). Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat. Immunol.*, 1, 413-418.
135. Strange,A., Capon,F., Spencer,C.C., Knight,J., Weale,M.E., Allen,M.H., Barton,A., Band,G., Bellenguez,C., Bergboer,J.G., Blackwell,J.M., Bramon,E., Bumpstead,S.J., Casas,J.P., Cork,M.J., Corvin,A., Deloukas,P., Dilthey,A., Duncanson,A., Edkins,S., Estivill,X., Fitzgerald,O., Freeman,C., Giardina,E., Gray,E., Hofer,A., Huffmeier,U., Hunt,S.E., Irvine,A.D., Jankowski,J., Kirby,B., Langford,C., Lascorz,J., Leman,J., Leslie,S., Mallbris,L., Markus,H.S., Mathew,C.G., McLean,W.H., McManus,R., Mossner,R., Moutsianas,L., Naluai,A.T., Nestle,F.O., Novelli,G., Onoufriadis,A., Palmer,C.N., Perricone,C., Pirinen,M., Plomin,R., Potter,S.C., Pujol,R.M., Rautanen,A., Riveira-Munoz,E., Ryan,A.W., Salmhofer,W., Samuelsson,L., Sawcer,S.J., Schalkwijk,J., Smith,C.H., Stahle,M., Su,Z., Tazi-Ahnini,R., Traupe,H., Viswanathan,A.C., Warren,R.B., Weger,W., Wolk,K., Wood,N., Worthington,J., Young,H.S., Zeeuwen,P.L., Hayday,A., Burden,A.D., Griffiths,C.E., Kere,J., Reis,A., McVean,G., Evans,D.M., Brown,M.A., Barker,J.N., Peltonen,L., Donnelly,P., and Trembath,R.C. (2010). A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. *Nat. Genet.*, 42, 985-990.
136. Szczypiorska,M., Sanchez,A., Bartolome,N., Arteta,D., Sanz,J., Brito,E., Fernandez,P., Collantes,E., Martinez,A., Tejedor,D., Artieda,M., and Mulero,J. (2011). ERAP1 polymorphisms and haplotypes are associated with ankylosing spondylitis susceptibility and functional severity in a Spanish population. *Rheumatology. (Oxford)*, 50, 1969-1975.
137. The TASK and WTCCC2 Consortia (2011). Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nat. Genet.*, 43, 761-767.
138. Van Endert,P.M., Riganelli,D., Greco,G., Fleischhauer,K., Sidney,J., Sette,A., and Bach,J.F. (1995). The peptide-binding motif for the human transporter associated with antigen processing. *J. Exp. Med.*, 182, 1883-1895.
139. Vassilakos,A., Cohen-Doyle,M.F., Peterson,P.A., Jackson,M.R., and Williams,D.B. (1996). The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class I histocompatibility molecules. *EMBO J.*, 15, 1495-1506.
140. Vigneron,N., Peaper,D.R., Leonhardt,R.M., and Cresswell,P. (2009). Functional significance of tapasin membrane association and disulfide linkage to ERp57 in MHC class I presentation. *Eur. J. Immunol.*, 39, 2371-2376.

141. Vinitzky,A., Anton,L.C., Snyder,H.L., Orlowski,M., Bennink,J.R., and Yewdell,J.W. (1997). The generation of MHC class I-associated peptides is only partially inhibited by proteasome inhibitors: involvement of nonproteasomal cytosolic proteases in antigen processing? *J. Immunol.*, 159, 554-564.
142. Wang,C.M., Ho,H.H., Chang,S.W., Wu,Y.J., Lin,J.C., Chang,P.Y., Wu,J., and Chen,J.Y. (2012). ERAP1 genetic variations associated with HLA-B27 interaction and disease severity of syndesmophytes formation in Taiwanese ankylosing spondylitis. *Arthritis Res. Ther.*, 14, R125.
143. Wearsch,P.A. and Cresswell,P. (2008). The quality control of MHC class I peptide loading. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 20, 624-631.
144. Wei,M.L. and Cresswell,P. (1992). HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain signal sequence-derived peptides. *Nature*, 356, 443-446.
145. Winchester,R., Minevich,G., Steshenko,V., Kirby,B., Kane,D., Greenberg,D.A., and Fitzgerald,O. (2012). HLA associations reveal genetic heterogeneity in psoriatic arthritis and in the psoriasis phenotype. *Arthritis Rheum.*, 64, 1134-1144.
146. Wong-Baeza,I., Ridley,A., Shaw,J., Hatano,H., Rysnik,O., McHugh,K., Piper,C., Brackenbridge,S., Fernandes,R., Chan,A., Bowness,P., and Kollnberger,S. (2013). KIR3DL2 binds to HLA-B27 dimers and free H chains more strongly than other HLA class I and promotes the expansion of T cells in ankylosing spondylitis. *J. Immunol.*, 190, 3216-3224.
147. WTCC Consortium (2007). Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat. Genet.*, 39, 1329-1337.
148. Yewdell,J.W., Anton,L.C., and Bennink,J.R. (1996). Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J. Immunol.*, 157, 1823-1826.
149. York,I.A., Bhutani,N., Zendzian,S., Goldberg,A.L., and Rock,K.L. (2006). Tripeptidyl Peptidase II Is the Major Peptidase Needed to Trim Long Antigenic Precursors, but Is Not Required for Most MHC Class I Antigen Presentation. *J. Immunol.*, 177, 1434-1443.
150. York,I.A., Chang,S.C., Saric,T., Keys,J.A., Favreau,J.M., Goldberg,A.L., and Rock,K.L. (2002). The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat. Immunol.*, 3, 1177-1184.
151. York,I.A., Mo,A.X., Lemerise,K., Zeng,W., Shen,Y., Abraham,C.R., Saric,T., Goldberg,A.L., and Rock,K.L. (2003). The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation. *Immunity.*, 18, 429-440.
152. Zemmour,J., Little,A.M., Schendel,D.J., and Parham,P. (1992). The HLA-A,B "negative" mutant cell line C1R expresses a novel HLA-B35 allele, which also has a point mutation in the translation initiation codon. *J. Immunol.*, 148, 1941-1948.

Apéndice I:

*Functional Interaction of the Ankylosing Spondylitis-associated Endoplasmic Reticulum
Aminopeptidase 1 Polymorphism and HLA-B27 in Vivo.*

Mol. Cell. Proteomics. 11, 1416-1429 2012.

‡§. García-Medel and A. Sanz-Bravo contributed equally to this work.

Apéndice II:

Alejandro Sanz-Bravo, José Campos, Marina S. Mazariegos, and José A. López de Castro, (2015). *Dominant role of the ERAP1 polymorphism R528K in shaping the HLA-B27 peptidome through differential processing determined by multiple peptide residues.* Arthr. & Rheum. 67, 692-701.

Apéndice III:

García-Medel, N., **Sanz-Bravo, A.**, Alvarez-Navarro, C., Gómez-Molina, P., Barnea, E., Marcilla, M., Admon, A., López de Castro, J.A., (2014). *Peptide Handling by HLA-B27 Subtypes Influences Their Biological Behavior, Association with Ankylosing Spondylitis and Susceptibility to Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 (ERAP1)*. Mol. Cell. Proteomics. 13, 3367–80. *El material suplementario de este artículo está incluido en la versión digital de esta Tesis.